



RECEIVED  
26 AUG 2003  
WIPO PCT

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

### COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

11 JUIN 2003  
Fait à Paris, le \_\_\_\_\_

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété Industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ  
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIETE  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
[www.inpi.fr](http://www.inpi.fr)



INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE  
26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11354\*01

### REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

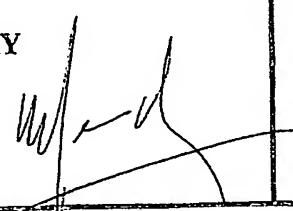
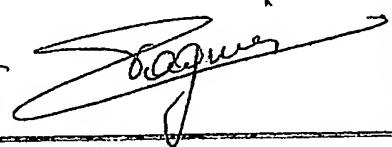
Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W 190200

REMISE DES PIÈCES		Réservé à l'INPI
DATE	<b>5 JUIN 2002</b>	
LIEU	<b>75 INPI PARIS</b>	
N° D'ENREGISTREMENT	<b>0206916</b>	
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		
DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI	<b>05 JUIN 2002</b>	
Vos références pour ce dossier (facultatif) <b>IFB 02 CD CNR WASO</b>		
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie		
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b> <input checked="" type="checkbox"/> Demande de brevet <input type="checkbox"/> Demande de certificat d'utilité  <input type="checkbox"/> Demande divisionnaire <i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>  <input type="checkbox"/> Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i> <input type="checkbox"/> N° Date <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  /  /  </span> <input type="checkbox"/> N° Date <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  /  /  </span> <input type="checkbox"/> N° Date <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  /  /  </span>		
<b>3 TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) <b>UTILISATION DE DERIVES DES BENZO[c]QUINOLIZINIUMS POUR LE TRAITEMENT DES PATHOLOGIES LIEES AUX PHENOMENES DE CONSTRICTION DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES</b>		
<b>4 DECLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		
<input type="checkbox"/> Pays ou organisation Date <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  /  /  </span> N° <input type="checkbox"/> Pays ou organisation Date <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  /  /  </span> N° <input type="checkbox"/> Pays ou organisation Date <span style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">  /  /  </span> N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»		
<b>5 DEMANDEUR</b> <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»		
Nom ou dénomination sociale <b>CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE</b>  Prénoms Forme juridique N° SIREN Code APE-NAF  Adresse <b>Rue</b> Code postal et ville <b>3, rue Michel-Ange</b>  Pays Nationalité N° de téléphone (facultatif) N° de télécopie (facultatif) Adresse électronique (facultatif)		
F-75794   <b>PARIS CEDEX 16</b> <b>FRANCE</b> <b>FRANCAISE</b>		

**BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2**

REMISE DES PIÈCES		Réservé à l'INPI
DATE	<b>5 JUIN 2002</b>	
LIEU	<b>75 INPI PARIS</b>	
N° D'ENREGISTREMENT	<b>0206916</b>	
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		
<b>Vos références pour ce dossier :</b> <i>(facultatif)</i>		<b>IFB 02 CD CNR VASO</b>
<b>6 MANDATAIRE</b> Nom <b>DEMACHY</b> Prénom <b>Charles</b> Cabinet ou Société <b>GROSSET-FOURNIER &amp; DEMACHY</b>  N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel  Adresse <b>20, rue de Maubeuge</b> Rue <b>75009 PARIS</b> Code postal et ville  N° de téléphone <i>(facultatif)</i> <b>01.42.81.09.58</b> N° de télécopie <i>(facultatif)</i> <b>01.42.81.08.71</b> Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		
<b>7 INVENTEUR (S)</b> Les inventeurs sont les demandeurs <input checked="" type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non <b>Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée</b>		
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b> Établissement immédiat ou établissement différé <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non		
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b> Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requise antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence)</i> :		
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> <i>(Nom et qualité du signataire)</i> <b>Charles DEMACHY</b> <b>Mandataire</b> <b>422.5/PP.170</b>		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>  

## UTILISATION DE DERIVES DES BENZO[c]QUINOLIZINIUMS POUR LE TRAITEMENT DES PATHOLOGIES LIEES AUX PHENOMENES DE CONSTRICION DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES

5

La présente invention a pour objet l'utilisation de dérivés des benzo[c]quinoliziniums dans le cadre du traitement de pathologies liées aux phénomènes de constriction des cellules musculaires lisses, telles que l'hypertension artérielle, ou l'asthme.

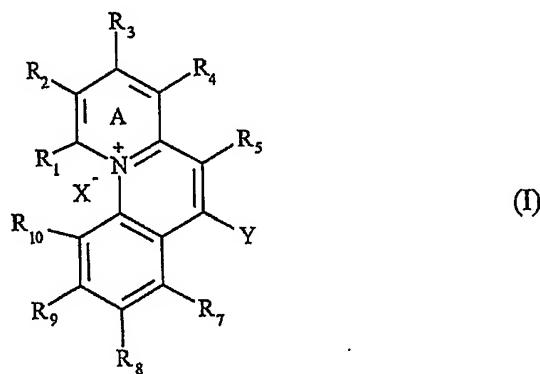
10 De nombreux activateurs moléculaires ont été synthétisés en vue de leur utilisation éventuelle dans le cadre du traitement de la mucoviscidose (Becq *et al.*, 1999; WO 98/05642). De ces synthèses chimiques sont apparues une série de composés substitués du benzo[c]quinolizinium (MPB) et, parmi ces molécules, les composés MPB-07 et MPB-91. Dans des cellules exprimant la protéine CFTR de manière endogène, il a été démontré, par des techniques d'efflux iodure et de patch clamp, que les MPB-07 et MPB-91 sont des activateurs de ce canal ionique (Becq *et al.*, 1999, Dérand *et al.*, 2001). Les inventeurs ont montré que ces deux molécules modifient la localisation de delF508-CFTR dans les cellules pulmonaires de patients homozygotes pour cette mutation, et qu'une activation du canal delF508 est restaurée après traitement (Dormer *et al.*, 2001). Le mécanisme d'action n'est pas établi mais ces deux molécules n'affectent pas l'activité ATPase des deux sites NBF (Dérand *et al.*, 2001), ni le taux d'AMPc intracellulaire ni les activités phosphatases et kinases des principales enzymes impliquées dans la régulation de CFTR (Becq *et al.*, 1999, Dérand *et al.*, 2001).

15 20 25 La présente invention découle de la mise en évidence par les inventeurs des effets du MPB-07 et du MPB-91 sur la réactivité vasculaire. Les inventeurs ont utilisé l'aorte de rat, organe ayant la propriété de se contracter (vasoconstriction) ou de se relaxer (vasorelaxation) sous l'action de différents agents moléculaires (endogènes ou exogènes) ou mécaniques. Ainsi les inventeurs ont démontré que les benzo[c]quinoliziniums décrits ci-après dans le cadre de la présente invention, tels que le MPB-07 et le MPB-91, sont des molécules capables de moduler le

tonus vasculaire chez l'homme et chez le rat en agissant sur l'activité des cellules musculaires lisses.

A ce titre, la présente invention a pour but de fournir de nouveaux médicaments destinés au traitement de pathologies liées à une constriction des cellules musculaires lisses dans les tissus telles que les pathologies liées aux phénomènes de vasoconstriction dans le cadre de troubles vasculaires, notamment l'hypertension artérielle, ou les pathologies liées aux phénomènes de bronchoconstriction dans le cadre de troubles de la respiration, notamment l'asthme.

La présente invention a pour objet l'utilisation de dérivés de formule générale (I) suivante :



dans laquelle :

- l'hétérocycle A est aromatique ou non, étant entendu que dans ce dernier cas l'atome d'azote de cet hétérocycle est lié par une double liaison au carbone en position 4a,

- R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> et R<sub>10</sub>, représentent, indépendamment les uns des autres :

25 . un atome d'hydrogène, ou  
      . un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome, ou de fluor, ou

30 . un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, linéaire ou ramifié, d'environ 1 à environ 10 atomes de carbone, ces groupes étant le cas échéant substitués, notamment par un halogène, et/ou par un hydroxyle, et/ou par une amine ( primaire, secondaire ou tertiaire), et/ou par un cycle aromatique et/ou

aliphatic, d'environ 5 à environ 10 atomes de carbone dans le cycle, ces cycles étant eux-mêmes, le cas échéant, substitués notamment par un halogène, et/ou par un hydroxyle, et/ou par une amine ( primaire, secondaire ou tertiaire), et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou

5            . un cycle aromatique ou aliphatic, d'environ 5 à environ 10 atomes de carbone dans le cycle, ce cycle étant lui-même, le cas échéant, substitué notamment par un halogène, et/ou par un hydroxyle, et/ou par une amine ( primaire, secondaire ou tertiaire), et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou

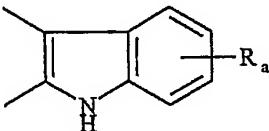
10            . un groupe  $-OR_a$ ,  $R_a$  représentant un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, linéaire ou ramifié, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou un cycle aromatique ou aliphatic, ces cycles étant tels que définis ci-dessus, ou

15            . un groupe  $-NR_bR_c$ ,  $R_b$  et  $R_c$ , indépendamment l'un de l'autre, représentant un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, linéaire ou ramifié, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou un cycle aromatique ou aliphatic, ces cycles étant tels que définis ci-dessus, ou

20            . lorsque  $R_1$  et  $R_2$ , et/ou  $R_3$  et  $R_4$ , et/ou  $R_4$  et  $R_5$ , et/ou  $R_7$  et  $R_8$ , et/ou  $R_8$  et  $R_9$ , et/ou  $R_9$  et  $R_{10}$ , ne représentent pas les différents atomes ou groupes ou cycles mentionnés ci-dessus, alors  $R_1$  en association avec  $R_2$ , et/ou  $R_2$  en association avec  $R_3$ , et/ou  $R_3$  en association avec  $R_4$ , et/ou  $R_4$  en association avec  $R_5$ , et/ou  $R_7$  en association avec  $R_8$ , et/ou  $R_8$  en association avec  $R_9$ , et/ou  $R_9$  en association avec  $R_{10}$ , forment respectivement avec  $C_1$  et  $C_2$ , ou avec  $C_2$  et  $C_3$ , ou avec  $C_3$  et  $C_4$ , ou avec  $C_4$ ,  $C_{4a}$  et  $C_5$ , ou avec  $C_7$  et  $C_8$ , ou avec  $C_8$  et  $C_9$ , ou avec  $C_9$  et  $C_{10}$ , un cycle aromatique ou aliphatic de 5 à 10 atomes de carbone, ce cycle étant le cas échéant substitué, notamment par un halogène, et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, et/ou par un cycle aromatique ou aliphatic, ces groupes ou cycles étant tels que définis ci-dessus, ou

lorsque R<sub>3</sub> et R<sub>4</sub> ne représentent pas les différents atomes ou groupes ou cycles mentionnés ci-dessus, alors R<sub>3</sub> en association avec R<sub>4</sub> forment un groupe indole de formule

5



dans laquelle R<sub>a</sub> est tel que défini ci-dessus,

- Y représente :

10 . un groupe -OR<sub>d</sub>, R<sub>d</sub> représentant un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, linéaire ou ramifié, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou un cycle aromatique ou aliphatique, ces cycles étant tels que définis ci-dessus, ou

15 . un groupe -NR<sub>e</sub>R<sub>f</sub>, R<sub>e</sub> et R<sub>f</sub> indépendamment l'un de l'autre, représentant un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, linéaire ou ramifié, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou un cycle aromatique ou aliphatique, ces cycles étant tels que définis ci-dessus,

. ou un groupe SH,

20 . étant entendu que lorsque R<sub>d</sub>, ou l'un au moins de R<sub>e</sub> ou de R<sub>f</sub>, ne représentent pas l'un des différents atomes ou groupes ou cycles mentionnés ci-dessus, alors R<sub>d</sub>, ou l'un au moins de R<sub>e</sub> ou de R<sub>f</sub>, en association avec R<sub>5</sub>, ou en association avec R<sub>7</sub>, forment respectivement avec C<sub>5</sub> et C<sub>6</sub>, ou avec C<sub>6</sub>, C<sub>6a</sub> et C<sub>7</sub>, un hétérocycle aromatique ou aliphatique de 5 à 10 atomes de carbone, le cas échéant substitué, notamment par un halogène, et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, et/ou par un cycle aromatique ou aliphatique, ces groupes ou cycles étant tels que définis ci-dessus,

25

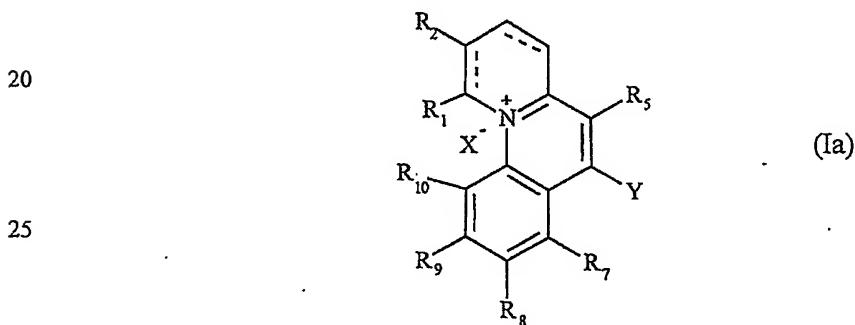
30

- X représente un atome sous forme anionique, tel qu'un atome d'halogène, notamment un atome de brome ou de chlore, ou un groupe d'atomes sous forme anionique, tel qu'un perchlorate, et l'azote de l'hétérocycle A de la formule (I) est sous forme quaternaire et est lié d'une part par liaison covalente au carbone en

position 11, et, d'autre part, par liaison ionique à X défini ci-dessus, étant entendu que lorsque R<sub>1</sub> et R<sub>10</sub> ne représentent pas l'un des différents atomes ou groupes ou cycles mentionnés ci-dessus, alors R<sub>1</sub> en association avec R<sub>10</sub> forment avec C<sub>1</sub>, l'azote de l'hétérocycle A de la formule (I), C<sub>11</sub>, et C<sub>10</sub>, un hétérocycle aromatique ou aliphatique de 5 à 10 atomes de carbone, le cas échéant substitué, notamment par un halogène, et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, et/ou par un cycle aromatique ou aliphatique, ces groupes ou cycles étant tels que définis ci-dessus,

pour la préparation de médicaments destinés au traitement de pathologies liées à une constriction des cellules musculaires lisses dans les tissus telles que les pathologies liées aux phénomènes de vasoconstriction dans le cadre de troubles vasculaires, notamment l'hypertension artérielle, ou les pathologies liées aux phénomènes de bronchoconstriction dans le cadre de troubles de la respiration, notamment l'asthme.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation telle que décrite ci-dessus, des dérivés des benzo[c]quinoliziniums de formule (Ia) suivante :



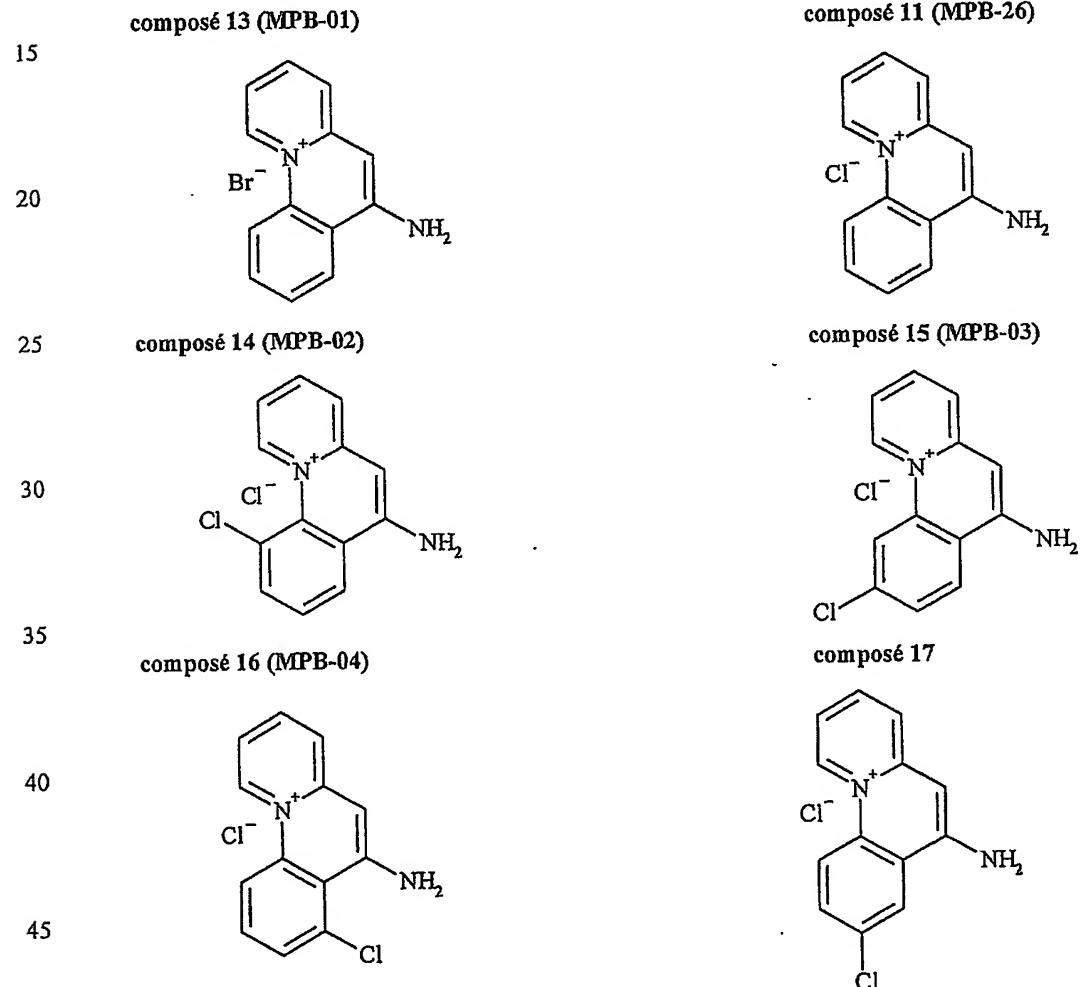
dans laquelle :

- 30 - R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> représentent un atome d'hydrogène, ou forment en association avec C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub> un cycle aromatique à 6 atomes de carbone,
- R<sub>5</sub> représente un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle linéaire ou substitué de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un groupe butyle, ou un ester de formule COOR' dans laquelle R' représente un groupe alkyle linéaire ou substitué de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un groupe éthyle,

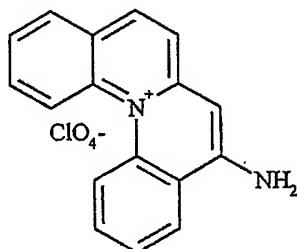
- Y représente un groupe -OH, -SH, -NH<sub>2</sub>, ou -NHCOCH<sub>3</sub>,
- R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> et R<sub>10</sub> représentent un atome d'hydrogène, ou l'un au moins de R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> ou R<sub>10</sub>, représente un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor,
- 5 - X représente un atome d'halogène sous forme anionique, notamment un atome de brome Br<sup>-</sup>, ou de chlore Cl<sup>-</sup>, ou un groupe d'atomes sous forme anionique.

L'invention a également plus particulièrement pour objet des dérivés des benzo[c]quinoliziniums de formule (Ia) tels que définis ci-dessus, dans laquelle Y représente un groupe -NH<sub>2</sub>, ou -NHCOCH<sub>3</sub>.

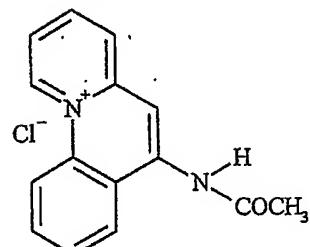
A ce titre, l'invention concerne plus particulièrement encore l'utilisation telle que décrite ci-dessus, des dérivés des benzo[c]quinoliziniums de formule (Ia) suivants :



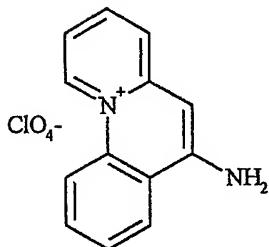
composé 22

5  
10

composé 23 (MPB-98)



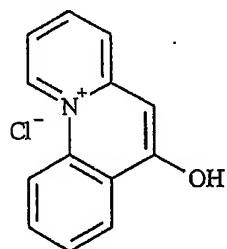
composé 24

15  
20

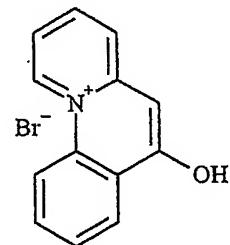
25 L'invention a également plus particulièrement pour objet l'utilisation telle que décrite ci-dessus, des dérivés des benzo[c]quinoliziniums de formule (Ia) tels que définis ci-dessus, dans laquelle Y représente OH.

30 A ce titre, l'invention concerne plus particulièrement encore l'utilisation telle que décrite ci-dessus, des dérivés des benzo[c]quinoliziniums de formule (Ia) suivants :

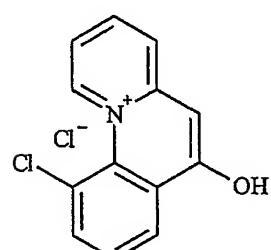
composé 12 (MPB-05)

35  
40

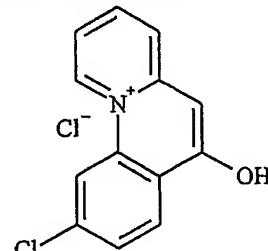
composé 18 (MPB-06)



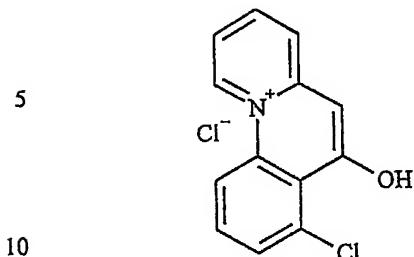
composé 19 (MPB-07)

45  
50

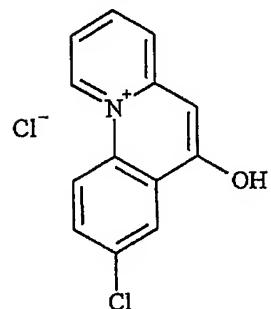
composé 20 (MPB-08)



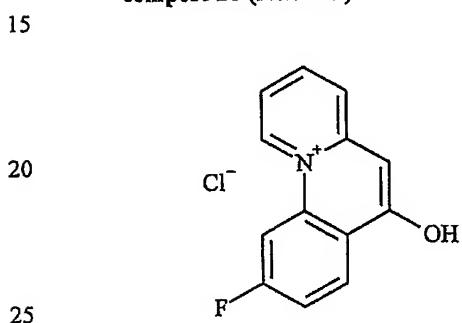
composé 21 (MPB-27)



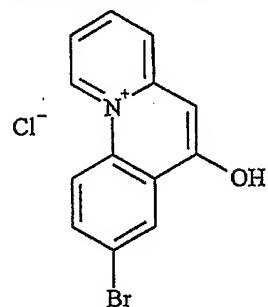
composé 25 (MPB-30)



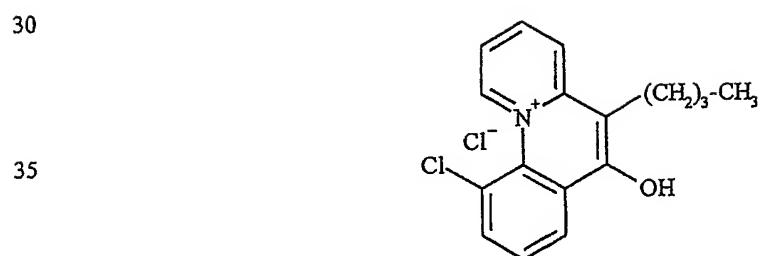
composé 26 (MPB-29)



composé 27 (MPB-32)

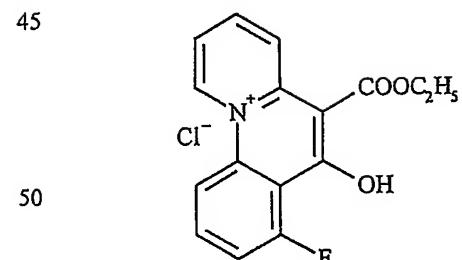


composé MPB-91

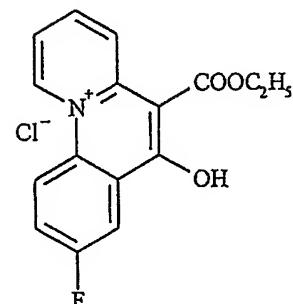


40

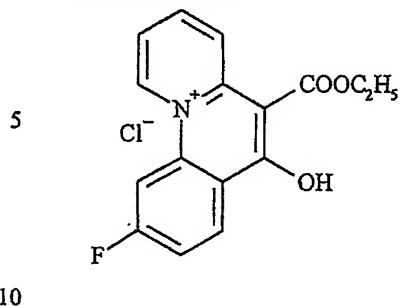
composé MPB 73



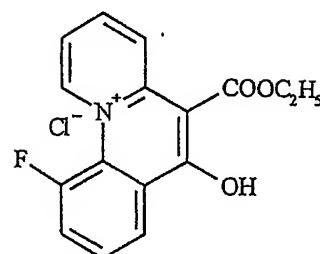
composé MPB 75



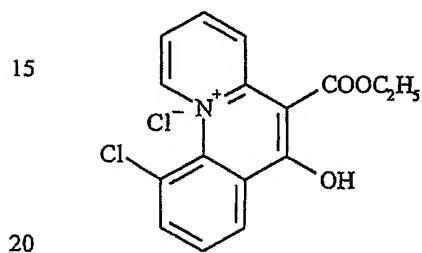
composé MPB 86



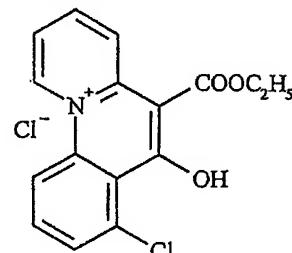
composé MPB 77



composé MPB 87



composé MPB 88

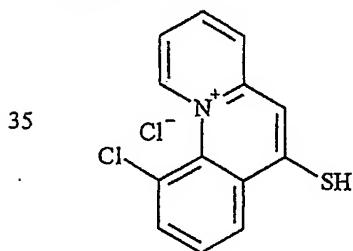


L'invention a également plus particulièrement pour objet l'utilisation telle que décrite ci-dessus, des dérivés des benzo[c]quinoliziniums de formule (Ia) tels que définis ci-dessus, dans laquelle Y représente SH.

A ce titre, l'invention concerne plus particulièrement encore l'utilisation telle que décrite ci-dessus, des dérivés des benzo[c]quinoliziniums de formule (Ia) suivants :

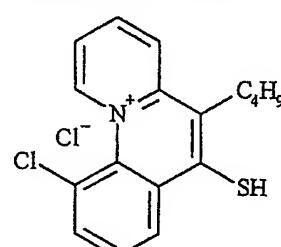
30

composé MPB 102



40

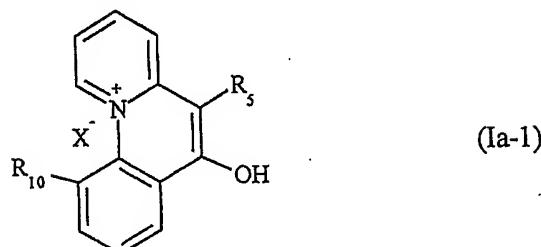
composé MPB 103



L'invention concerne également l'utilisation telle que décrite ci-dessus de dérivés de formule générale (Ia-1) suivante :

5

10



dans laquelle :

- 15 - R<sub>5</sub> représente un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle linéaire ou substitué de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un groupe butyle,
- R<sub>10</sub> représente un atome un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor,
- X représente un atome d'halogène sous forme anionique, notamment un atome de brome Br<sup>-</sup>, ou de chlore Cl<sup>-</sup>, ou un groupe d'atomes sous forme anionique.

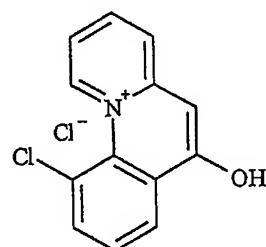
20 L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée du dérivé de formule (Ia-1) définie ci-dessus, et correspondant au composé MPB-07 de formule suivante :

25

composé 19 (MPB-07)

30

35

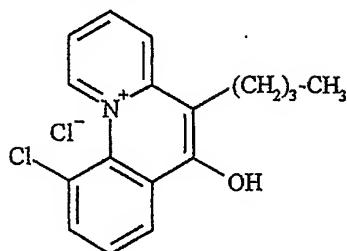


L'invention concerne plus particulièrement également l'utilisation susmentionnée du dérivé de formule (Ia-1) définie ci-dessus, et correspondant au composé MPB-91 de formule suivante :

## composé MPB-91

5

10

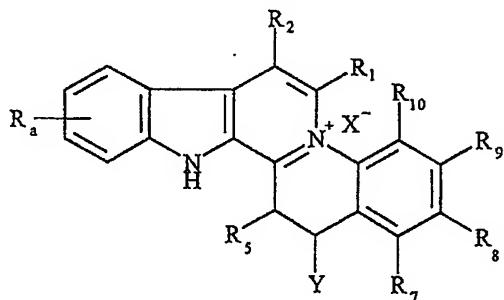


15

20

25

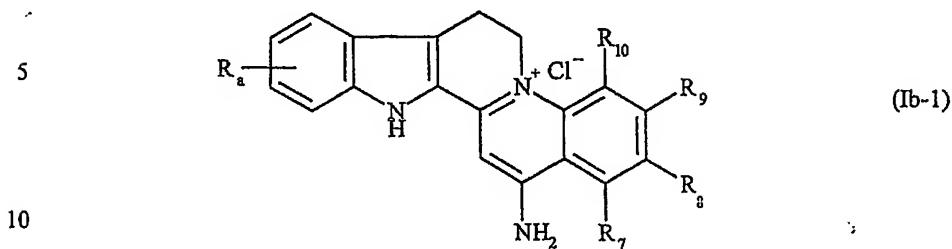
(Ib)



30 dans laquelle R<sub>a</sub>, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub>, X et Y sont tels que définis ci-dessus, et notamment les composés de formule (Ib) dans laquelle :

- R<sub>a</sub> représente un atome d'hydrogène,
- R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> représentent un atome d'hydrogène, et il n'y a pas de double liaison entre les deux carbones portant R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub>,
- R<sub>5</sub> représente un atome d'hydrogène,
- R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> et R<sub>10</sub> représentent un atome d'hydrogène, ou l'un de R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> ou R<sub>10</sub> représente un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor,
- Y représente NH<sub>2</sub>, ou OH,
- X représente un atome d'halogène, notamment un atome de brome, ou de chlore, ou de fluor.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée de dérivés de formule (Ib-1) suivante :



dans laquelle R<sub>2</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub>, sont tels que définis ci-dessus,  
et plus particulièrement les composés de formule (Ib-1) suivants :

- composé G : R<sub>7</sub> = Cl, R<sub>8</sub> = R<sub>9</sub> = R<sub>10</sub> = H,
- composé H : R<sub>7</sub> = R<sub>8</sub> = R<sub>9</sub> = R<sub>10</sub> = H,
- composé I : R<sub>8</sub> = Cl, R<sub>7</sub> = R<sub>9</sub> = R<sub>10</sub> = H,
- composé J : R<sub>9</sub> = Cl, R<sub>7</sub> = R<sub>8</sub> = R<sub>10</sub> = H,
- composé K : R<sub>10</sub> = Cl, R<sub>7</sub> = R<sub>8</sub> = R<sub>9</sub> = H,
- composé L : R<sub>9</sub> = Br, R<sub>7</sub> = R<sub>8</sub> = R<sub>10</sub> = H.

20 L'invention a également pour objet les composés de formule (I)  
susmentionnée dans laquelle R<sub>5</sub> représente un ester de formule COOR' dans  
laquelle R' représente un groupe alkyle linéaire ou substitué de 1 à 10 atomes de  
carbone, notamment un groupe éthyle.

25 L'invention a plus particulièrement pour objet les composés de formule (Ia)  
susmentionnée dans laquelle :

- R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> représentent un atome d'hydrogène, ou forment en association  
avec C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub> un cycle aromatique à 6 atomes de carbone,
- R<sub>5</sub> représente un ester de formule COOR' dans laquelle R' représente un  
groupe alkyle linéaire ou substitué de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un  
groupe éthyle,
- Y représente un groupe -OH, -SH, -NH<sub>2</sub>, ou -NHCOCH<sub>3</sub>,
- R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> et R<sub>10</sub> représentent un atome d'hydrogène, ou l'un au moins de  
R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> ou R<sub>10</sub>, représente un atome d'halogène, notamment un atome de  
chlore, de brome ou de fluor,

- X représente un atome d'halogène sous forme anionique, notamment un atome de brome Br<sup>-</sup>, ou de chlore Cl<sup>-</sup>, ou un groupe d'atomes sous forme anionique.

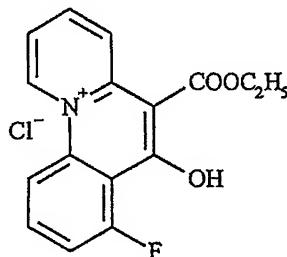
L'invention a plus particulièrement pour objet encore les composés de formule (Ia) susmentionnée dans laquelle R<sub>5</sub> représente un ester de formule COOR' dans laquelle R' représente un groupe alkyle linéaire ou substitué de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un groupe éthyle, et Y représente un groupe -OH.

A ce titre, l'invention concerne plus particulièrement les composés de formule (Ia) susmentionnée, et répondant aux formules suivantes :

10

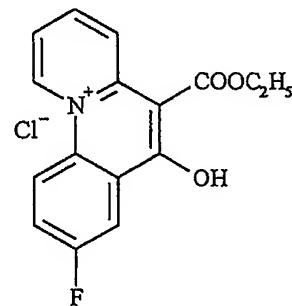
composé MPB 73

15



20

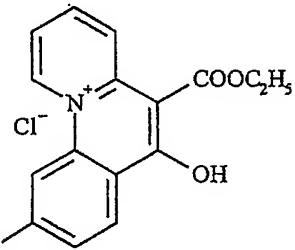
composé MPB 75



25

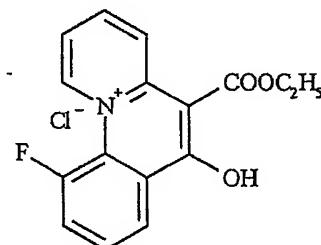
composé MPB 86

25



30

composé MPB 77

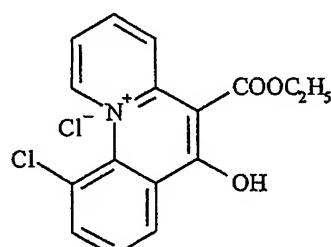


35

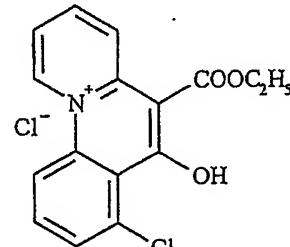
composé MPB 87

35

40



composé MPB 88



L'invention a également pour objet les composés de formule (I) susmentionnée dans laquelle Y représente SH.

5 L'invention a plus particulièrement pour objet les composés de formule (Ia) susmentionnée dans laquelle :

- R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> représentent un atome d'hydrogène, ou forment en association avec C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub> un cycle aromatique à 6 atomes de carbone,

- R<sub>5</sub> représente - R<sub>5</sub> représente un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle linéaire ou substitué de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un groupe butyle,

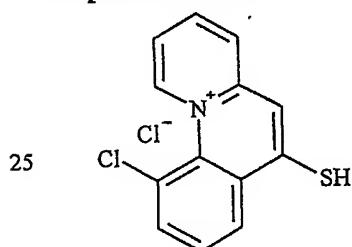
10 - Y représente un groupe -SH,

- R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> et R<sub>10</sub> représentent un atome d'hydrogène, ou l'un au moins de R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> ou R<sub>10</sub>, représente un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor,

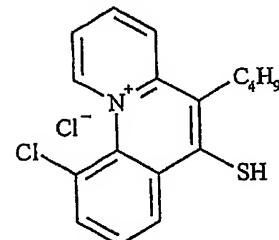
15 - X représente un atome d'halogène sous forme anionique, notamment un atome de brome Br<sup>-</sup>, ou de chlore Cl<sup>-</sup>, ou un groupe d'atomes sous forme anionique.

A ce titre, l'invention concerne plus particulièrement les composés de formule (Ia) susmentionnée, et répondant aux formules suivantes :

20 composé MPB 102



composé MPB 103



30

L'invention a également pour objet toute composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe(s) actif(s), au moins un des composés de formule générale (I) décrite ci-dessus, et plus particulièrement au moins un des composés de formule (Ia) susmentionnée dans laquelle R<sub>5</sub> représente un ester de formule COOR' dans laquelle R' représente un groupe alkyle linéaire ou substitué de 1 à 10

atomes de carbone, notamment un groupe éthyle, et/ou Y représente SH, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet les compositions pharmaceutiques susmentionnées comprenant au moins le composé MPB 73, 5 MPB 75, MPB 86, MPB 77, MPB 87, MPB 88, MPB 102, ou MPB 103, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

Des compositions pharmaceutiques préférées utilisées dans le cadre de la présente invention sont celles comprenant le composé 19 (encore désigné MPB-07), ou le composé MPB-91, le cas échéant en association avec un (ou plusieurs) 10 autre(s) composé(s) de l'invention décrit(s) ci-dessus.

Avantageusement les compositions pharmaceutiques selon l'invention se présentent sous une forme administrable par voie orale, notamment sous forme de comprimés, ou de gélules, ou sous une forme administrable par voie parentérale, notamment sous forme de préparations injectables par voie intraveineuse, 15 intramusculaire, ou sous-cutanée, ou encore par voie aérienne, notamment par voie pulmonaire sous forme d'aérosols.

Avantageusement encore, les compositions pharmaceutiques selon l'invention, sont caractérisées en ce que les quantités de principe(s) actif(s) sont telles que la posologie journalière en principe(s) actif(s) est d'environ 0,1 mg/kg à 20 5 mg/kg, notamment d'environ 3 mg/kg, en une ou plusieurs prises.

S'agissant de la synthèse des composés de formulé (I) de l'invention, celle-ci est amplement détaillée dans la demande internationale WO 98/05642, ainsi que dans l'article de Becq et al., 1999, et de Dérand et al., 2001.

L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui 25 suit de la synthèse de nouveaux composés de l'invention, et de l'étude des composés de l'invention dans la cadre de la vasodilatation.

I) Préparation des composés MPB 73, MPB 75, MPB 86, MPB 77, MPB  
87, et MPB 88

Dans un tricol muni d'une arrivée d'azote et d'une ampoule à brome, une  
5 solution de BuLi 0.025 mole est ajoutée goutte à goutte à la seringue à une  
solution de 4.03 g (0.025 mole) de 1,1,1,3,3,3-hexaméthyldisilazane dans 10 mL  
de THF (à -5°C). Le mélange est agité à -5°C pendant 30 min. Une solution de  
10 3.30 g (0.02 mole) de 2-pyridylacétate d'éthyle dans 25 mL de THF est ajoutée  
goutte à goutte sur 2 h. Puis une solution de 0.018 mole de chlorure de benzoyle  
difuoré (MPB 73, MPB 75, MPB 86, MPB 77), ou dichloré (MPB 87, et MPB  
15 88) dans 10 mL de THF est ajoutée sur 1 h. Le mélange est maintenu sous  
agitation à -5°C pendant 1 h et 2 h à température du laboratoire. Après hydrolyse  
par 20 mL d'eau, le solvant est éliminé sous pression réduite.

Les composés cyclisés lors de l'évaporation du solvant de réaction, sont purifiés  
15 par chromatographie colonne sur gel de silice, élution par l'acétate d'éthyle.  
0.0003 mole des composés précédemment obtenus sont mis en solution dans un  
mélange de chlorure de méthylène anhydre (5 mL) et d'éther anhydre (50 mL),  
l'alcool chlorhydrique est ajouté jusqu'à fin de précipitation. Le précipité est  
filtré sur Büchner puis rincé à l'éther anhydre.

20

Chlorure de 5-carboxyéthyl-6-hydroxy-10-fluorobenzofc]quinolizinium MPB 77

*Produit pulvérulent crème*

Rendement : 50%

25 Point de fusion : 134°C

Analyse élémentaire calculée pour C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>ClF, 0.5 H<sub>2</sub>O : C, 58.10 ; H,  
4.26 ; N, 4.23. Trouvé C, 58.62 ; H, 3.88 ; N, 4.16.

RMN <sup>1</sup>H (DMSO<sub>d</sub><sub>6</sub>) δ ppm, signal, n protons, attribution : 8.9, pic mal résolu,  
30 1H, H<sub>1</sub>; 8.2 à 6.9, multiplet, 6H, protons aromatiques ; 6.3, 1H, singulet, OH ;  
4.3, quadruplet (J=7 Hz), 2H, CH<sub>2</sub>; 1.3, triplet (J=7 Hz), 3H, CH<sub>3</sub>.

IR (KBr)  $\nu$  cm<sup>-1</sup>, attribution : 3420 OH, 3171 3080 C=C-H, 2973 C-C-H, 1718 C=O, 1628, 1560, 1520, 1506, 1458, 1312, 1284, 1267, 1193, 1175, 1026, 824, 774.

5 Chlorure de 5-carboxyéthyl-6-hydroxy-9-fluorobenzo[c]quinolizinium MPB 86

Produit pulvérulent jaune

Rendement : 63%

Point de fusion : 154°C

10 Analyse élémentaire calculée pour C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>ClF : C, 59.73 ; H, 4.07 ; N, 4.35. Trouvé C, 59.58 ; H, 4.10 ; N, 4.28.

RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm, signal, n protons, attribution : 9.2, doublet (J=8 Hz), 1H, H<sub>1</sub> ; 8.7 à 7.1, multiplet, 6H, protons aromatiques ; 5.7, singulet échangeable, 1H, OH ; 4.3, quadruplet (J=7 Hz), 2H, CH<sub>2</sub>; 1.3, triplet (J=7 Hz), 3H, CH<sub>3</sub>.

15 IR (KBr)  $\nu$  cm<sup>-1</sup>, attribution : 3454 OH, 3104 3047 3016 C=C-H, 2960 C-C-H, 1727 C=O, 1609, 1535, 1471, 1435, 1323, 1308, 1259, 1215, 1108, 1017, 831, 764.

20 Chlorure de 5-carboxyéthyl-6-hydroxy-8-fluorobenzo[c]quinolizinium MPB 75

Produit pulvérulent jaune

Rendement : 28%

Point de fusion : 168°C

25 Analyse élémentaire calculée pour C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>ClF : C, 59.73 ; H, 4.07 ; N, 4.35. Trouvé C, 59.54 ; H, 4.07 ; N, 4.24.

RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm, signal, n protons, attribution : 9.4, doublet (J=9 Hz), 1H, H<sub>1</sub> ; 8.9 à 8.7, multiplet, 1H, proton aromatique ; 8.2 à 7.0, multiplet, 5H, protons aromatiques ; 6.0, singulet échangeable, 1H, OH ; 4.3, quadruplet (J=8 Hz), 2H, CH<sub>2</sub>; 1.3, triplet (J=8 Hz), 3H, CH<sub>3</sub>.

IR (KBr)  $\nu$  cm<sup>-1</sup>, attribution : 3500 OH, 3157 3049 C=C-H, 2960 C-C-H,  
1670, 1626, 1590, 1532, 1503, 1457, 1323, 1259, 1209, 1006, 885, 792.

Chlorure de 5-carboxyéthyl-6-hydroxy-7-fluorobenzo[c]quinolizinium MPB 73

5

**Produit pulvérulent crème**

Rendement : 27%

Point de fusion : 173°C

Analyse élémentaire calculée pour C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>ClF, 0.5 H<sub>2</sub>O : C, 58.10 ; H, 4.26 ; N, 4.23. Trouvé C, 57.99 ; H, 4.12 ; N, 4.97.

RMN <sup>1</sup>H (DMSO<sub>d</sub><sub>6</sub>) δ ppm, signal, n protons, attribution : 9.0, doublet (J=8 Hz), 1H, H<sub>1</sub>; 8.4 à 6.8, multiplet, 7H, protons aromatiques + OH ; 4.2, quadruplet (J=7 Hz), 2H, CH<sub>2</sub>; 1.3, triplet (J=7 Hz), 3H, CH<sub>3</sub>.

IR (KBr)  $\nu$  cm<sup>-1</sup>, attribution : 3420 OH, 3160 3101 3046 C=C-H, 2984 C-C-H,  
1720 C=O, 1646, 1617, 1601, 1501, 1446, 1409, 1347, 1323, 1274, 1227,  
1134, 1011, 814, 779.

5-n-Butyl-10-chloro-6-hydroxybenzo[c]quinolizinium chloride (MPB-91)

Le 2-pentylpyridine a été obtenu dans un premier temps par condensation du 2-picollyllithium avec le 1-bromobutane à -40°C, et purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice à l'aide de dichlorométhane en tant qu'éluent. Puis, le 2-pentylpyridine 4.48 g (0.03 mol) en solution dans du THF (30 mL) a été traité à 0°C avec du diisopropylamide de lithium (0.033 mol), refroidi à -40°C, et le 2,3-dichlorobenzoate de méthyle 3.08 g (0.015 mol) dans du THF (15 mL) a été ajouté. Le mélange a été agité 1 h à -40°C et hydrolysé à 20°C avec 10 mL d'eau. La phase organique a été séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentré sous vide et purifiée par chromatographie sur colonne avec de l'éther de pétrole et de l'acétate d'éthyle en tant qu'éluent. Le produit pur a été chauffé à 200°C pendant 1 h. Le résidu a été chromatographié sur floril sur dichlorométhane afin d'obtenir la cétone cyclique. Cette dernière a été solubilisée dans l'éther anhydre et une solution de HCl/éthanol a été additionnée

goutte à goutte. Produit pulvérulent crème ; point de fusion = 160°C, rendement: 15 %. Anal. C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>1</sub>O<sub>1</sub>Cl<sub>2</sub>; C, 63.37; H, 5.32; N, 4.35; Trouvé: C, 63.36; H, 5.27; N, 4.32. IR (KBr): 3439, 3121., 2951, 2923, 2895, 2863, 2496, 2344, 1629, 1589, 1502, 1488, 1457, 1400. <sup>1</sup>H NMR (Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  9.25 (*J* = 7 Hz, 1 H, H1), 8.5 (d, *J* = 7 Hz, 1 H), 8.1-6.9 (m, 5H + OH), 2.9 (t, *J* = 4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.5-1.3 (m, 4H, 2 CH<sub>2</sub>), 0.9 (t, 3 H, CH<sub>3</sub>). Spectre de masse (ESI): 286 (M-HCl).

## 10 II) Effets pharmacologiques des composés de l'invention

Les effets pharmacologiques des composés de la famille des benzo[c]quinolizinium, activateurs de CFTR: le chlorure de 6-hydroxy-10-chlorobenzo[c]quinolizinium (nom de référence : MPB-07) et de 5-butyl-6-hydroxy-10-chlorobenzo[c]quinolizinium (nom de référence : MPB-91), ont été étudiés sur des anneaux d'aorte isolée de rat et d'artères mammaires humaines.

Les résultats montrent les faits suivants

- (1) MPB-91 (EC<sub>50</sub> = 21  $\mu$ M) et MPB-07 (EC<sub>50</sub> = 134  $\mu$ M) ont un effet vasorelaxant dose-dépendant, réversible et lent, sur les deux préparations.
- 20 (2) Ces composés activent un transport anionique dans les cellules musculaires lisses. Le profil d'activation de ce transport (MPB-91, MPB-07) est similaire à celui rencontré dans les cellules épithéliales exprimant la protéine CFTR.

### 25 Effets vaso-dilatateur des composés de la famille benzo[c]quinolizinium.

## MATERIEL ET METHODES

### A. Matériel biologique

Prélèvement et dissection de l'aorte de Rat

Les expérimentations sont réalisées sur l'aorte thoracique de rats mâles de souche Wistar de 200 à 250 g âgés de 7 à 8 semaines. Le rat est assommé puis placé en décubitus dorsal. Après thoracotomie, le segment d'aorte compris entre le diaphragme et la crosse aortique est excisé. Le morceau d'aorte est immédiatement placé dans une solution physiologique tamponnée de type Krebs modifié. L'aorte est sectionnée en anneaux de 5 mm.

5  
Abrasion de l'endothélium

10 Pour certaines préparations, l'endothélium est enlevé mécaniquement à l'aide d'une aiguille entourée de fil que l'on fait tourner dans l'anneau d'aorte. Ce procédé ne lèse pas les cellules musculaires lisses.

15  
B. Technique des organes isolés

Montage dans la cuve à organes isolés

Les anneaux d'aorte, après dissection, sont suspendus entre deux crochets dont l'un est fixe et l'autre mobile. Ce montage est placé dans une cuve en Plexiglas (Emka Technologies), thermostatée à 37°C, contenant 5 ml de solution physiologique oxygénée par un mélange gazeux (95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>). L'enceinte thermostatée est alimentée par un bain-marie. Le crochet mobile est suspendu à un capteur relié à l'interface (transducteur mécanoélectrique). Cette interface est reliée d'une part à un amplificateur (amplification du signal) et d'autre part à un ordinateur (visualisation et analyse du signal). Le programme IOX 1.565 permet le traitement et la visualisation des signaux sur l'écran d'ordinateur. Les programmes Data Analyst et Prism 3.0 permettent l'analyse des résultats.

25  
Principe de fonctionnement

La force isométrique développée par les préparations artérielles est transformée en une différence de potentiel qui est amplifiée puis transcrise en un signal visualisé sur un écran d'ordinateur.

**Méthodologie**

Après le montage des anneaux d'aorte dans le dispositif expérimental, ceux-ci sont étirés à une tension basale de 2.5 g. Cette tension correspond au point optimum de leur relation tension/longueur. L'attente de l'état stable dans le milieu physiologique de référence se réalise sur une période d'environ 1 heure avec un lavage toutes les 20 minutes. A la suite de cette période d'équilibration, les différentes expériences sont réalisées.

10           **Test de la fonction endothéliale**

Afin de s'affranchir des mécanismes de relaxation/contraction dus à l'endothélium, certaines préparations sont débarrassées de celui-ci par destruction mécanique. Pour s'assurer de la destruction effective de l'endothélium, un test cholinergique (ACh  $10^{-4}$  M) est réalisé au terme de la première période 15 d'équilibration, sur des préparations précontracturées par une solution hyperpotassique (80 mM de KCl). Ce test est considéré valide si l'ajout d'ACh ne provoque pas de relaxation et que la préparation reste à l'état contractée.

20           Suite à ce test, les préparations subissent plusieurs lavages successifs afin de retrouver un état stable. Une fois l'état stable atteint, les différentes expériences peuvent être réalisées. Les contractures dues aux solutions hyperpotassiques sont obtenues par remplacement total de la solution physiologique de référence par la 25 solution hyperpotassique. L'administration des substances pharmacologiques se fait de façon cumulative et directement dans les cuves à organes isolés en prenant garde que le volume additionnel ne soit pas trop élevé. L'application de chaque nouvelle concentration ne se fait qu'après stabilisation. Afin de rendre compte de l'état de réactivité de la préparation en fin de manipulation, un test hyperpotassique ou noradrénergique est effectué. Si la préparation réagit dans le sens d'une contracture, le test est validé.

C. Les différentes solutions physiologiques et les substances pharmacologiques utilisées

Solutions physiologiques

5 La composition de la solution physiologique de référence est une solution de type Krebs modifié : NaCl : 120mM ; KCl : 4,7mM ; CaCl<sub>2</sub> : 2,5mM ; MgCl<sub>2</sub> : 1,2mM ; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 1,2mM ; NaHCO<sub>3</sub> : 15mM ; Hepes : 10mM ; Glucose : 11mM ; pH = 7,4. Des solutions hyperpotassiques contenant différentes concentrations de KCl ont été préparées selon le même principe. Ces solutions 10 sont utilisées pour provoquer une contracture de l'anneau d'aorte par dépolarisation des cellules musculaires lisses. La solution hyperpotassique majoritairement utilisée dans les expériences contient 80 mM de KCl.

Substances pharmacologiques

- 15 - MPB-07 (chlorure de 6-hydroxy-10-chlorobenzo[c]quinolizinium)  
 - MPB-91 (chlorure de 5-butyl-6-hydroxy-10-chlorobenzo[c]quinolizinium)  
 - Artérénol (norépinephrine, SIGMA, USA)  
 - ACh (acétylcholine, SIGMA, USA)  
 - L-NAME (N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester, SIGMA, USA)  
 20 - MPB-70 (10-chlorobenzo[c]quinolizine-6-one)  
 - Vérapamil (SIGMA, USA)

D. Les efflux d'iodure

La technique des efflux d'iodure, mise au point par Venglarick et al. (1990), 25 permet la mesure des mouvements d'ions et est décrite en détail dans Dérard et al. (2001).

Méthodologie

Les anneaux d'aorte de taille équivalente, sont incubés dans 1 ml de solution 30 de charge composée de solution physiologique de type Krebs modifié ou hyperpotassique (80 mM KCl) supplémentée de 1,5 µl/ml de Na <sup>125</sup>I et 0,1 µl/ml

de KI. Après 1 h 30 d'incubation à 37°C, 4 rinçages successifs de deux minutes sont réalisés dans 1 ml de solution physiologique appropriée (solution Krebs normale ou hyperpotassique). Une cinétique d'efflux d'iodure des anneaux d'aorte est réalisée pendant 12 min. Après chaque minute, le contenu de chaque puits est prélevé et placé dans des tubes à hémolyse, et la radioactivité est comptée par un compteur gamma (Packard, Cobra II). A la 12<sup>e</sup> minute, les anneaux d'aorte sont solubilisés dans du Dodécyl Sulfate de Sodium (SDS 0,1%) + NaOH (0,1M). Cette étape permet la récupération de la radioactivité résiduelle par destruction cellulaire.

10

#### Présentation des résultats

La radioactivité totale des cellules est calculée par l'addition des coups par minute (cpm) de chaque fraction collectée et des cpm de la fraction solubilisée (radioactivité résiduelle). Les courbes sont tracées en exprimant les efflux en pourcentage du contenu cellulaire accumulé dans le milieu en fonction du temps. Par exemple, la valeur attribuée au temps  $t_n$ , correspond à :  $100 \times (\sum \text{cpm obtenus de } t_0 \text{ à } t_n) / \text{radioactivité totale}$ . La vitesse instantanée de sortie est présentée selon la formule  $\ln(\frac{\text{It}_1}{\text{It}_2}) / (t_1 - t_2)$ , où  $t_1$  et  $t_2$  sont deux temps successifs et  $\text{It}_1$  et  $\text{It}_2$  sont les efflux mesurés aux temps  $t_1$  et  $t_2$ . Pour évaluer l'effet d'une substance, on détermine le rapport d'activation  $r = \text{vitesse de sortie après stimulation} / \text{vitesse de sortie avant stimulation}$ . Les résultats (moyenne  $\pm$  SEM) sont comparés à l'aide du test statistique de Student pour une valeur appariée.

## RESULTATS

25

### A. ORGANES ISOLES

#### 1 / Expériences témoins

30

■ Contracture hyperpotassique et contracture par l'artérénol (*figure 1A B*)

Après un état de stabilité des anneaux d'aorte en solution normale de type Krebs, la totalité de la solution est remplacée par une solution hyperpotassique contenant 80 mM de KCl. Cette solution a pour effet de contracter les anneaux d'aorte par dépolarisation des cellules musculaires lisses. La figure 1A montre que la contracture obtenue en milieu hyperpotassique est stable dans le temps. Elle est prise comme contrôle (100% de la contracture) dans les différentes expériences réalisées. La contracture par l'artérénol ( $10^{-4}$  M) se fait par ajout directement dans la cuve contenant la solution normale de type Krebs. Le mécanisme qui conduit à la contracture de l'aorte est différent. L'artérénol se fixe sur un récepteur adrénergique de type alpha 1 intégré à la membrane des cellules musculaires lisses. C'est la voie classique via le DAG et l'IP<sub>3</sub>, qui permet la contracture.

■ Validation de la technique de désendothélisation

Afin de vérifier la présence ou non de l'endothélium, le test cholinergique est utilisé. Après contracture de l'anneau d'aorte en milieu hyperpotassique (80 mM de KCl), de l'ACh ( $10^{-4}$  M) est ajouté dans la cuve. Les résultats montrent que les anneaux d'aorte *sans endothélium* restent contracté alors que les anneaux d'aorte *avec endothélium* se relaxent (environ 40% de relaxation). Dans cette étude ce test a été validé.

■ Effets de différents solvants, solutions et substances

Avant de commencer les expérimentations, différents tests témoins de diverses substances ont été pratiqués afin d'anticiper leurs effets éventuels sur les préparations. L'ajout d'eau et de DMSO (diméthylsulfoxyde), solvants principaux de la majorité des substances injectées aux préparations, n'ont aucun effet sur les anneaux d'aorte, que ceux-ci soient en solution Krebs normale ou en solution hyperpotassique.

■ Contrôle du pH

Les solutions Krebs normale ou hyperpotassique ont un pH de 7,4. Sur une expérience de 7 heures, ce pH ne présente aucune dérive, dans les deux conditions. Après ajout de MPB-07 ou autres substances pharmacologiques utilisées, le pH ne présente aucune dérive dans le temps.

■ Dérive de la contracture des anneaux d'aorte dans le temps

Les anneaux d'aorte précontracturés soit par une solution hyperpotassique soit par de l'artérénol, présentent une contracture stable dans le temps, une heure environ après l'état stable de contracture acquis.

**2/ Effet du MPB-07 sur des anneaux d'aorte précontracturés en solution hyperpotassique**

15 ■ Anneaux d'aorte avec endothélium (*figure 2 A ; figure 3A*)

Le MPB-07 provoque une relaxation dose-dépendante des anneaux d'aorte avec endothélium comme le montre la figure 2A. Les résultats présentés figure 3A sont en pourcentage de la contracture maximale obtenue en solution hyperpotassique. La figure 3A montre que sur des anneaux d'aorte avec endothélium, le MPB-07 présente une  $EC_{50} = 132,4 \pm 0,02 \mu\text{M}$  ( $n = 14$ ). La relaxation est effective à partir de  $80 \mu\text{M}$  ( $24 \pm 1,6\%$  de relaxation,  $n = 14$ ) et atteint  $96 \pm 1,75\%$  ( $n = 14$ ) pour  $500 \mu\text{M}$ .

25 ■ Anneaux d'aorte sans endothélium (*figure 3B*)

Le MPB-07 provoque une relaxation dose-dépendante des anneaux d'aorte sans endothélium. Cette molécule a donc une action endothélium indépendante. Les résultats sont présentés en pourcentage de la contracture maximale obtenue en solution hyperpotassique. Sur les anneaux d'aorte sans endothélium, la figure 3B montre que le MPB-07 présente un  $EC_{50} = 92,90 \pm 0,02 \mu\text{M}$  ( $n = 7$ ). La relaxation est probante à partir de  $80 \mu\text{M}$  ( $37 \pm 5,6\%$  de relaxation,  $n = 7$ ) et atteint  $99 \pm 1\%$  ( $n = 7$ ) à  $250 \mu\text{M}$ . En comparaison avec le résultat précédent, le MPB-07

semble plus efficace sur les anneaux d'aorte *sans endothélium* que sur les anneaux d'aorte *avec endothélium*, les deux EC<sub>50</sub> sont significativement différents (test de Student, p<0,01). L'absence de l'endothélium joue donc un rôle sur l'effet relaxant provoqué par le MPB-07.

5

■ Anneaux d'aorte avec endothélium + L-NAME (*figure 2B ; figure 3C*)

La L-NAME a été utilisée afin d'inhiber les mécanismes de régulation par l'endothélium sur les cellules musculaires lisses et dans le but de mimer une absence de l'endothélium. Cette molécule est un inhibiteur de la NO (nitric oxyde) synthase présente dans les cellules endothéliales. La L-NAME (10<sup>-4</sup> M) est ajoutée dans la solution hyperpotassique 30 minutes avant la gamme de MPB-07. Le MPB-07 provoque une relaxation dose-dépendante des anneaux d'aorte avec endothélium traités par la L-NAME comme le montre la figure 2B. Les résultats (figure 3C) sont présentés en pourcentage de la contracture maximale obtenue en solution hyperpotassique après l'ajout de la L-NAME. Le MPB-07 présente un EC<sub>50</sub> = 51,80 ± 0,008 µM (n = 8). La relaxation se prononce à partir de 40 µM (33 ± 6,15% de relaxation, n = 8) et atteint 98 ± 1,3% pour 160 µM. En comparaison avec les résultats précédents, la présence de L-NAME potentialise l'effet vasorelaxant du MPB-07.

20

■ Anneaux d'aorte sans endothélium en présence de L-NAME (*figure 3D*)

L'effet du MPB-07 a été testé sur des anneaux d'aorte sans endothélium et en présence de L-NAME pour bloquer la voie de régulation par le NO. Dans cette situation, le MPB-07 provoque une relaxation dose-dépendante des anneaux d'aorte avec un EC<sub>50</sub> = 55,1 ± 0,2 µM (n = 7). Il est à noter que les courbes « avec endothélium + L-NAME » et « sans endothélium + L-NAME » sont comparables. Les figures 5A et 5B présentent les différences statistiques entre la courbe « avec endothélium » et les courbes « sans endothélium » et « avec endothélium + L-NAME ».

### 3/ Réversibilité de l'effet MPB-07 (*figure 4A*)

Nous venons de montrer que le MPB-07 induisait une vasorelaxation des anneaux d'aorte précontracturés en solution hyperpotassique. Cet effet est réversible comme le montre la figure 4A. Dans cette expérience l'ajout de MPB-07 en dose unique (135 $\mu$ M) provoque une relaxation des anneaux d'aorte avec endothélium précontracturés en milieu hyperpotassique. Après un état stable de relaxation, les anneaux sont lavés en milieu physiologique normal afin de revenir à l'état basal de contracture, puis contracté de nouveau en milieu hyperpotassique. Les résultats (n = 4) montrent, une réactivité positive des anneaux d'aorte, après une dose unique de MPB-07, ceux-ci retrouvant leur contracture hyperpotassique initiale. Ces résultats montrent la réversibilité de l'effet relaxant du MPB-07.

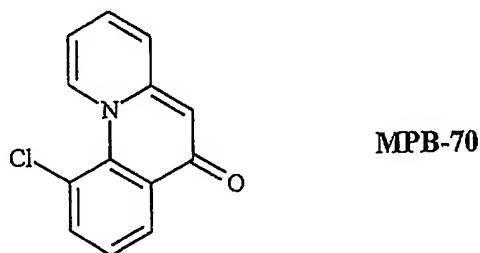
### 4/ Effet du MPB-07 sur des anneaux d'aorte précontracturés par de l'artérénol

La figure 4B montre que l'ajout de MPB-07 (10  $\mu$ M) provoque une relaxation des anneaux d'aorte avec endothélium précontracturés par de l'artérénol ( $10^{-4}$ M). Les résultats montrent  $90 \pm 9\%$  de relaxation au bout de 2h30. Des oscillations rapides de contracture sont observables. Ces variations transitoires présentent une amplitude qui augmente en fonction du temps. L'ajout de vérapamil (inhibiteur canaux Ca<sub>L</sub>, 200  $\mu$ M) stoppe ces variations.

### 5/ Comparaison de l'effet du MPB-07 avec l'effet du MPB-91 et MPB-70 (*figure 5C et 6*)

Le MPB-07 et MPB-91 sont des activateurs de CFTR. Il nous est paru intéressant de comparer leur effets avec le MPB-70 un analogue inactif sur CFTR des cellules épithéliales, et dont la formule est la suivante

30



35

De 10  $\mu\text{M}$  à 80  $\mu\text{M}$  l'effet des 2 molécules est semblable, les résultats ne présentent pas de différence statistiquement significative. A 160  $\mu\text{M}$ , le MPB-70 relaxe les anneaux d'aorte ( $n = 7$ ) de 27 % contre 64 % par le MPB-07 ( $n = 14$ ) : cette différence est significative (\*\*\*) ;  $p < 0,001$ . A 250  $\mu\text{M}$ , le MPB-70 provoque 42 % de relaxation des anneaux d'aorte alors que le MPB-07 à cette même concentration provoque 88 % de relaxation (différence statistiquement significative,  $p < 0,001$ ). A 500  $\mu\text{M}$ , le MPB-07 relaxe à 100% les anneaux d'aorte alors que le pourcentage de relaxation par le MPB-70 ne varie peu (46 %) et reste le même pour des concentrations supérieures. La comparaison des courbes doses/réponses présentée figure 6 montre que le MPB-91 ( $\text{EC}_{50} = 21 \mu\text{M}$ ) est plus efficace que le MPB-07 ( $\text{EC}_{50} = 133 \mu\text{M}$ ).

## 6/ Conclusion

Cette étude montre que :

- 15      ➤        Le MPB-07 et le MPB-91 ont un effet vasorelaxant dose-dépendant, réversible et lent, sur les anneaux d'aorte précontracturés.
- L'inhibition de la voie de la NO-synthase par la L-NAMÉ renforce cet effet pharmacologique.
- 20      ➤        L'ordre d'efficacité des composés est MPB-91>MPB-07>>MPB-70 sur ces préparations suit celui observé sur le CFTR épithélial humain.
- 

## B. LES EFFLUX D'IODURE

25      La technique des efflux d'iodure a été utilisée pour caractériser les transports anioniques et leur mode de stimulation par le MPB-07. Cette technique permet de tracer un transport ionique dans une cellule chargée au préalable avec le radiotraceur correspondant. Nous avons adapté cette technique utilisée en routine au laboratoire pour l'étude sur des anneaux d'aorte.

30      Nous avons d'abord étudié les cinétiques de sortie de  $^{125}\text{I}$  des cellules musculaires lisses des anneaux d'aorte (dépourvus d'endothélium) à l'état basal,

c'est-à-dire en absence de stimulation. Ces expériences ont été réalisées dans deux conditions : en milieu physiologique normal et en milieu hyperpotassique. Cette étude permet de comparer les résultats obtenus après stimulation des anneaux d'aorte. Les résultats montrent que la sortie d'iodure s'effectue régulièrement en fonction du temps. L'efflux basal correspond à la diffusion passive de la charge radioactive en dehors des cellules. Ces expériences montrent que l'absence de vitesse de sortie correspond à l'absence de stimulation d'un transport anionique.

**1/ Effet du MPB-07 sur les efflux d'iodure, sur des anneaux d'aorte sans endothélium en milieu hyperpotassique (80 mM KCl) (figure 7A et 8A)**

Dans une même situation expérimentale que celle utilisée en organes isolés l'ajout de MPB-07 provoque une augmentation de l'efflux d'iodure comme le montre la figure 7A. La vitesse de sortie augmente de  $0,053 \pm 0,005$  à l'état basal à  $0,076 \pm 0,008$  (augmentation de 0,023) une minute après l'addition de MPB-07, puis  $0,099 \pm 0,013$  (soit une augmentation de 0,046) 2 minutes après l'addition de la molécule (résultats de  $n = 8$  expériences). Ces résultats montrent que le MPB-07 active un transport anionique dans ces conditions. La figure 8A montre les différences statistiques entre la vitesse de sortie avant et après stimulation par le MPB-07.

**2/ Effet du MPB-07 sur les efflux d'iodure, sur des anneaux d'aorte avec endothélium traités à la L-NAME, en milieu hyperpotassique (figure 7B et 8B)**

L'ajout de MPB-07 provoque une augmentation de l'efflux (figure 7B). En présence de

L-NAME ( $10^{-4}$  M) cette augmentation est plus élevée que dans l'expérience précédente. En effet, la vitesse de sortie passe de 0,059 à l'état basal à  $0,103 \pm 0,017$  (augmentation de 0,044) une minute après l'addition de MPB-07, puis à  $0,110 \pm 0,015$  (augmentation de 0,051) 2 minutes après l'ajout de MPB-07, pour atteindre  $0,119 \pm 0,011$  (augmentation de 0,060) 3 minutes après l'addition de la

molécule (résultats de  $n = 4$  expériences). L'augmentation de vitesse de sortie est statistiquement significative par rapport à la valeur basale (figure 8B). Ces résultats montrent que le transport anionique activé par le MPB-07 ( $250 \mu\text{M}$ ) est potentialisé par la présence de L-NAME. L'inhibition de la NO synthase potentialise l'activation d'un transport anionique par le MPB-07. Ce résultat conforte les résultats obtenus en organes isolés.

**3/ Effet du MPB-70 sur les efflux d'iodure, sur des anneaux d'aorte sans endothélium, en milieu hyperpotassique (figure 7C et 8C)**

Le MPB-70 est une molécule de la même famille que le MPB-07, mais inactive sur le canal CFTR. Comme en organes isolés, le MPB-70 a été testé en efflux de radiotraceurs. Sur les anneaux d'aorte, l'addition de MPB-70 ne provoque pas d'augmentation de la vitesse de sortie. La vitesse de sortie passe de  $0,056 \pm 0,002$  à  $0,053 \pm 0,003$  une minute après l'addition de MPB-70. Cette vitesse n'atteint que  $0,055 \pm 0,005$ , 2 minutes après l'ajout de la molécule.

**4/ Effet du MPB-07 sur les efflux d'iodure, sur des anneaux d'aorte sans endothélium en milieu physiologique normal (figure 7D et 8D)**

La stimulation par le MPB-07 entraîne une faible activation de l'efflux d'iodure. Ceci se traduit par une augmentation de la vitesse de sortie qui passe de  $0,044 \pm 0,009$  à  $0,076 \pm 0,016$  sur  $n = 3$  expériences. Statistiquement cette augmentation est non significative (ns) comme le montre la figure 8D.

**5/ Conclusion**

Le MPB-07 active un transport anionique dans les cellules musculaires lisses, potentialisé par la L-NAME. Le profil d'activation de ce transport (MPB-07>>>MPB-70) est similaire à celui rencontré dans les cellules épithéliales exprimant le CFTR humain. Des effets similaires ont été observé avec le composé MPB-91.

*Légende des figures*

Figure 1 : A. Tracé représentatif d'une contraction d'anneaux d'aorte par une solution hyperpotassique

5 B. Tracé représentatif d'une contraction d'anneaux d'aorte par de l'artérénol ( $10^{-4}$  M)

10 Figure 2 : Tracés représentatifs d'une gamme de MPB-07 : A. sur des anneaux d'aorte avec endothélium précontractés en solution hyperpotassique ; B. sur des anneaux d'aorte avec endothélium précontractés en solution hyperpotassique, en présence de L-NAME ( $10^{-4}$  M) en préincubation 30 min avant l'ajout de MPB-07.

15 Figure 3 : Courbes représentant le pourcentage de contraction des anneaux d'aorte en fonction du logarithme décimal de la concentration en MPB-07 (en M). La gamme de MPB-07 (10, 20, 40, 80, 160, 250, 500 et 1000  $\mu$ M) est réalisée sur des anneaux d'aorte précontractés en solution hyperpotassique (80 mM de KCl) :  
A. avec endothélium, moyenne  $\pm$  SEM de n = 14 expériences réalisées sur 4 rats ;  
B. sans endothélium, moyenne  $\pm$  SEM de n = 7 expériences réalisées sur 2 rats ;  
20 C. avec endothélium, en présence de L-NAME ( $10^{-4}$  M) en préincubation 30 min avant l'ajout de MPB-07, moyenne  $\pm$  SEM de n = 8 expériences réalisées sur 2 rats ; D. sans endothélium, en présence de L-NAME ( $10^{-4}$  M) en préincubation 30 min avant l'ajout de MPB-07, moyenne  $\pm$  SEM de n = 7 expériences réalisées sur 2 rats. Le pourcentage de contraction est calculé par rapport à la valeur de tension maximale obtenue en solution hyperpotassique. Les résultats sont normalisés par rapport à cette valeur.

25 Figure 4 : A. Tracé représentatif de la réversibilité de l'effet du MPB-07 (135  $\mu$ M) sur des anneaux d'aorte avec endothélium B. Tracé représentatif de l'effet du MPB-07 (à 10  $\mu$ M) sur des anneaux d'aorte avec endothélium précontractés par de l'artérénol ( $10^{-4}$  M).

**Figure 5 : Comparaison statistique des doses / réponses du MPB-07 entre des anneaux d'aorte :** A. avec endothélium et sans endothélium B. avec endothélium et avec endothélium en présence de L-NAME ( $10^{-4}$  M) ; C. Comparaison des doses / réponses du MPB-07 et du MPB-70 sur des anneaux d'aorte avec endothélium. Les résultats sont présentés en pourcentage de contraction en fonction du logarithme décimal de la concentration en MPB-07. Les valeurs de contraction pour chaque concentration sont comparées statistiquement, par le test de Student.

ns : différence non significative entre les 2 valeurs comparées  
 \* : différence significative entre les 2 valeurs comparées,  $p < 0,05$   
 \*\* : différence significative entre les 2 valeurs comparées,  $p < 0,01$

**Figure 6 : Comparaison des courbes doses / réponses du MPB-07 et MPB-91:** Les résultats sont présentés en pourcentage de contraction en fonction du logarithme décimal de la concentration en MPB-07.

**Figure 7 : Résultats représentatifs des efflux d'iodure sur des anneaux d'aorte sans endothélium :** A. en présence de MPB-07 (250  $\mu$ M) en milieu hyperpotassique ; B. en présence de MPB-07 (250  $\mu$ M) en milieu hyperpotassique et L-NAME ( $10^{-4}$ M) en préincubation 30 min avant l'ajout de MPB-07 ; C. en présence de MPB-70 (250  $\mu$ M) en milieu hyperpotassique ; D. en présence de MPB-07 (250  $\mu$ M) en milieu physiologique normal.

Le MPB-07 ou MPB-70 est ajouté au bout de 4 min. La valeur au temps 4 min est prise comme valeur contrôle. La vitesse de sortie est représentée en fonction du temps.

**Figure 8 : Représentation du rapport de la valeur de vitesse de sortie obtenue après différents temps de stimulation et de la valeur de vitesse de sortie avant stimulation.**

A. stimulation par MPB-07 en milieu hyperpotassique, moyenne  $\pm$  SEM de n = 8 expériences; B. stimulation par MPB-07 en milieu hyperpotassique, en présence de L-NAME ( $10^{-4}$  M) 30 min avant l'ajout, moyenne  $\pm$  SEM de n = 4 expériences ; C. stimulation par MPB-70, en milieu hyperpotassique, moyenne  $\pm$  SEM de n = 4 expériences ; D. stimulation par MPB-07 en milieu physiologique normal, moyenne  $\pm$  SEM de n = 3 expériences. Les résultats sont comparés statistiquement (t test Student) par rapport à la valeur basale.

5

ns : différence non significative par rapport à la valeur basale

10

\* : différence significative par rapport à la valeur basale,  $p < 0,05$

\*\* : différence significative par rapport à la valeur basale,  $p < 0,01$

### III) Bibliographie

15 DORMER, R.L., DERAND, R., MCNEILLY, C.M., METTEY, Y., BULTEAU-PIGNOUX, L., METAYE, T., VIERFOND, J.M., GRAY, M.A., GALIETTA, L.J., MORRIS, M.R., PEREIRA, M.M., DOULL, I.J., BECQ, F. & MCPHERSON, M.A. (2001). Correction of delF508-CFTR activity with benzo(c)quinolizinium compounds through facilitation of its processing in cystic fibrosis airway cells. In *J Cell Sci.* pp. 4073-81.

20

BECQ, F., METTEY, Y., GRAY, M.A., GALIETTA, L.J., DORMER, R.L., MERTEN, M., METAYE, T., CHAPPE, V., MARVINGT-MOUNIR, C., ZEGARRA-MORAN, O., TARRAN, R., BULTEAU, L., DERAND, R., PEREIRA, M.M., MCPHERSON, M.A., ROGIER, C., JOFFRE, M., ARGENT, B.E., SARROUILHE, D., KAMMOUNI, W., FIGARELLA, C., VERRIER, B., GOLA, M. & VIERFOND, J.M. (1999). Development of substituted Benzo[c]quinolizinium compounds as novel activators of the cystic fibrosis chloride channel. *J Biol Chem.* 274, 27415-25.

25

30

DERAND, R., BULTEAU-PIGNOUX, L., METTEY, Y., ZEGARRA-MORAN, O., HOWELL, L.D., RANDAK, C., GALIETTA, L.J., COHN, J.A., NOREZ, C., ROMIO, L., VIERFOND, J.M., JOFFRE, M. & BECQ, F. (2001). Activation of G551D CFTR channel with MPB-91: regulation by ATPase activity and phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol*, **281**, C1657-66.

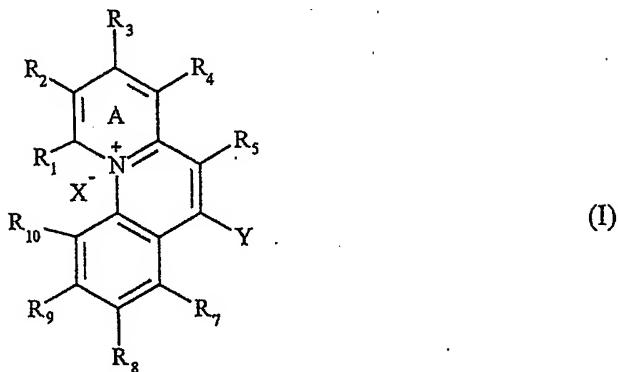
VENGLARIK, C.J., BRIDGES, R.J. & FRIZZELL, R.A. (1990). A simple assay for agonist-regulated Cl and K conductances in salt-secreting epithelial cells. *Am J Physiol*, **259**, C358-64.

## REVENDICATIONS

1. Utilisation de dérivés de formule générale (I) suivante :

5

10



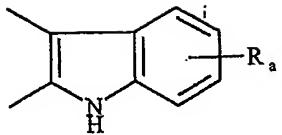
dans laquelle :

- l'hétérocycle A est aromatique ou non, étant entendu que dans ce dernier cas l'atome d'azote de cet hétérocycle est lié par une double liaison au carbone en position 4a,

-  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_7, R_8, R_9$  et  $R_{10}$ , représentent, indépendamment les uns des autres :

- . un atome d'hydrogène, ou
- 20 . un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, ou de brome, ou de fluor, ou
- . un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, linéaire ou ramifié, d'environ 1 à environ 10 atomes de carbone, ces groupes étant le cas échéant substitués, notamment par un halogène, et/ou par un hydroxyle, et/ou par une amine ( primaire, secondaire ou tertiaire), et/ou par un cycle aromatique et/ou aliphatique, d'environ 5 à environ 10 atomes de carbone dans le cycle, ces cycles étant eux-mêmes, le cas échéant, substitués notamment par un halogène, et/ou par un hydroxyle, et/ou par une amine ( primaire, secondaire ou tertiaire), et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou

- un cycle aromatique ou aliphatique, d'environ 5 à environ 10 atomes de carbone dans le cycle, ce cycle étant lui-même, le cas échéant, substitué notamment par un halogène, et/ou par un hydroxyle, et/ou par une amine ( primaire, secondaire ou tertiaire), et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou
- 5            un groupe -OR<sub>a</sub>, R<sub>a</sub> représentant un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, linéaire ou ramifié, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou un cycle aromatique ou aliphatique, ces cycles étant tels que définis ci-dessus, ou
- 10          un groupe -NR<sub>b</sub>R<sub>c</sub>, R<sub>b</sub> et R<sub>c</sub>, indépendamment l'un de l'autre, représentant un atome d'hydrogène, un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, linéaire ou ramifié, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou un cycle aromatique ou aliphatique, ces cycles étant tels que définis ci-dessus, ou
- 15          lorsque R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub>, et/ou R<sub>3</sub> et R<sub>4</sub>, et/ou R<sub>4</sub> et R<sub>5</sub>, et/ou R<sub>7</sub> et R<sub>8</sub>, et/ou R<sub>8</sub> et R<sub>9</sub>, et/ou R<sub>9</sub> et R<sub>10</sub>, ne représentent pas les différents atomes ou groupes ou cycles mentionnés ci-dessus, alors R<sub>1</sub> en association avec R<sub>2</sub>, et/ou R<sub>2</sub> en association avec R<sub>3</sub>, et/ou R<sub>3</sub> en association avec R<sub>4</sub>, et/ou R<sub>4</sub> en association avec R<sub>5</sub>, et/ou R<sub>7</sub> en association avec R<sub>8</sub>, et/ou R<sub>8</sub> en association avec R<sub>9</sub>, et/ou R<sub>9</sub> en association avec R<sub>10</sub>, forment respectivement avec C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub>, ou avec C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub>, ou avec C<sub>3</sub> et C<sub>4</sub>, ou avec C<sub>4</sub>, C<sub>4a</sub> et C<sub>5</sub>, ou avec C<sub>7</sub> et C<sub>8</sub>, ou avec C<sub>8</sub> et C<sub>9</sub>, ou avec C<sub>9</sub> et C<sub>10</sub>, un cycle aromatique ou aliphatique de 5 à 10 atomes de carbone, ce cycle étant le cas échéant substitué, notamment par un halogène, et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, et/ou par un cycle aromatique ou aliphatique, ces groupes ou cycles étant tels que définis ci-dessus, ou
- 20          lorsque R<sub>3</sub> et R<sub>4</sub> ne représentent pas les différents atomes ou groupes ou cycles mentionnés ci-dessus, alors R<sub>3</sub> en association avec R<sub>4</sub> forment un groupe indole de formule
- 25          lorsque R<sub>3</sub> et R<sub>4</sub> ne représentent pas les différents atomes ou groupes ou cycles mentionnés ci-dessus, alors R<sub>3</sub> en association avec R<sub>4</sub> forment un groupe indole de formule



5 dans laquelle R<sub>a</sub> est tel que défini ci-dessus,

- Y représente :

10 . un groupe -OR<sub>d</sub>, R<sub>d</sub> représentant un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, linéaire ou ramifié, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou un cycle aromatique ou aliphatique, ces cycles étant tels que définis ci-dessus, ou

15 . un groupe -NR<sub>e</sub>R<sub>f</sub>, R<sub>e</sub> et R<sub>f</sub> indépendamment l'un de l'autre, représentant un atome d'hydrogène, un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, linéaire ou ramifié, ces groupes étant tels que définis ci-dessus, ou un cycle aromatique ou aliphatique, ces cycles étant tels que définis ci-dessus,

20 . étant entendu que lorsque R<sub>d</sub>, ou l'un au moins de R<sub>e</sub> ou de R<sub>f</sub>, ne représentent pas l'un des différents atomes ou groupes ou cycles mentionnés ci-dessus, alors R<sub>d</sub>, ou l'un au moins de R<sub>e</sub> ou de R<sub>f</sub>, en association avec R<sub>5</sub>, ou en association avec R<sub>7</sub>, forment respectivement avec C<sub>5</sub> et C<sub>6</sub>, ou avec C<sub>6</sub>, C<sub>6a</sub> et C<sub>7</sub>, un hétérocycle aromatique ou aliphatique de 5 à 10 atomes de carbone, le cas échéant substitué, notamment par un halogène, et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, et/ou par un cycle aromatique ou aliphatique, ces groupes ou cycles étant tels que définis ci-dessus,

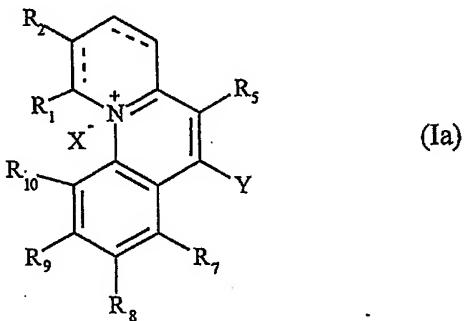
25 - X représente un atome sous forme anionique, tel qu'un atome d'halogène, notamment un atome de brome ou de chlore, ou un groupe d'atomes sous forme anionique, tel qu'un perchlorate, et l'azote de l'hétérocycle A de la formule (I) est sous forme quaternaire et est lié d'une part par liaison covalente au carbone en position 11, et, d'autre part, par liaison ionique à X défini ci-dessus, étant entendu que lorsque R<sub>1</sub> et R<sub>10</sub> ne représentent pas l'un des différents atomes ou groupes ou cycles mentionnés ci-dessus, alors R<sub>1</sub> en association avec R<sub>10</sub> forment avec C<sub>1</sub>, l'azote de l'hétérocycle A de la formule (I), C<sub>11</sub>, et C<sub>10</sub>, un hétérocycle

aromatique ou aliphatique de 5 à 10 atomes de carbone, le cas échéant substitué, notamment par un halogène, et/ou par un groupe alkyle, alkoxy, carbonyle, oxycarbonyle, ou ester, et/ou par un cycle aromatique ou aliphatique, ces groupes ou cycles étant tels que définis ci-dessus,

pour la préparation de médicaments destinés au traitement de pathologies liées à une constriction des cellules musculaires lisses dans les tissus telles que les pathologies liées aux phénomènes de vasoconstriction dans le cadre de troubles vasculaires, notamment l'hypertension artérielle, ou les pathologies liées aux phénomènes de bronchoconstriction dans le cadre de troubles de la respiration, notamment l'asthme.

2. Utilisation selon la revendication 1, des dérivés des benzo[c]quinoliziniums de formule (Ia) suivante :

15



20

25

dans laquelle :

- R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> représentent un atome d'hydrogène, ou forment en association avec C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub> un cycle aromatique à 6 atomes de carbone,
- R<sub>5</sub> représente un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle linéaire ou substitué de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un groupe butyle, ou un ester de formule COOR' dans laquelle R' représente un groupe alkyle linéaire ou substitué de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un groupe éthyle,
- Y représente un groupe -OH, -SH, -NH<sub>2</sub>, ou -NHCOCH<sub>3</sub>,

- R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> et R<sub>10</sub> représentent un atome d'hydrogène, ou l'un au moins de R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> ou R<sub>10</sub>, représente un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor,

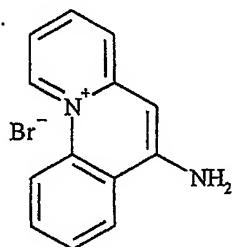
5 - X représente un atome d'halogène sous forme anionique, notamment un atome de brome Br<sup>-</sup>, ou de chlore Cl<sup>-</sup>, ou un groupe d'atomes sous forme anionique.

10 3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, des dérivés des benzo[c]quinoliziniums de formule (Ia) dans laquelle Y représente un groupe -NH<sub>2</sub>, ou -NHCOC<sub>3</sub>.

4. Utilisation selon la revendication 3, des dérivés des benzo[c]quinoliziniums de formule (Ia) suivants :

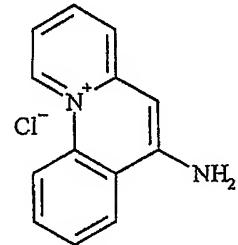
15

composé 13 (MPB-01)



20

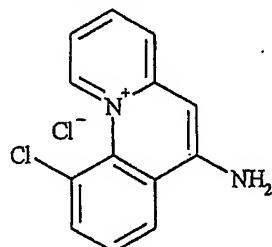
composé 11 (MPB-26)



25

30

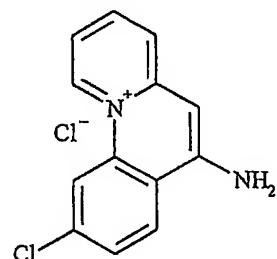
composé 14 (MPB-02)



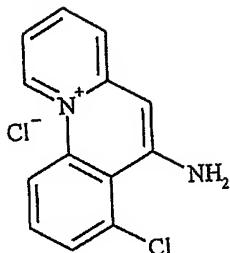
35

40

composé 15 (MPB-03)

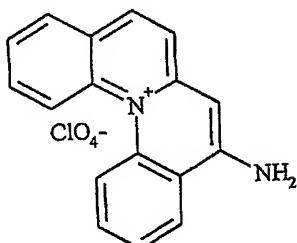


composé 16

5  
10

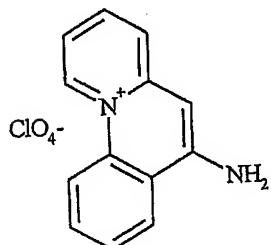
15

composé 22

20  
25

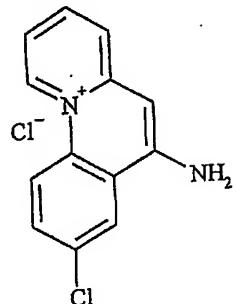
30

composé 24

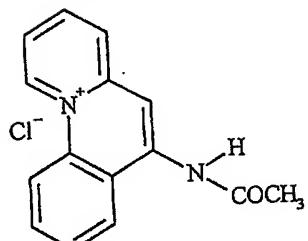


35

composé 17



composé 23



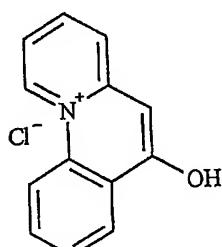
40

5. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, de dérivés des benzo[c]quinoliziniums de formule (Ia) dans laquelle Y représente OH.

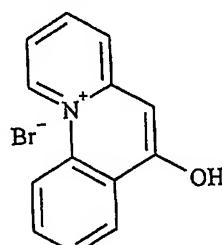
45

6. Utilisation selon la revendication 5, de dérivés des benzo[c]quinoliziniums de formule (Ia) choisis parmi les suivants :

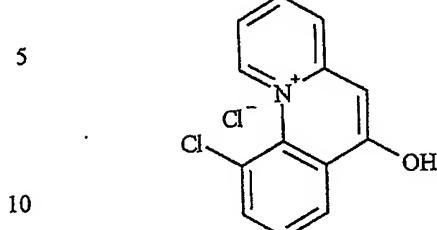
composé 12 (MPB-05)

45  
50

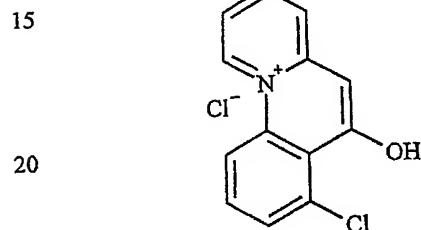
composé 18 (MPB-06)



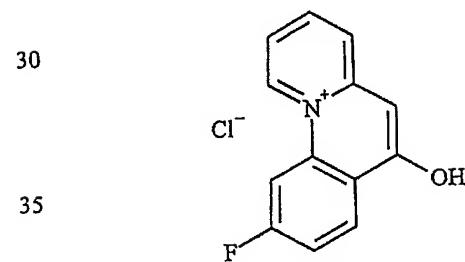
composé 19 (MPB-07)



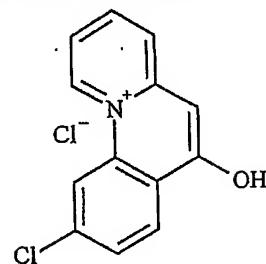
composé 21 (MPB-27)



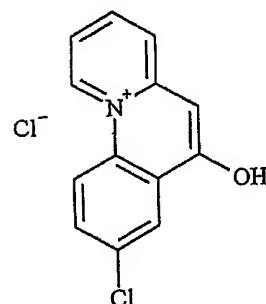
composé 26 (MPB-29)



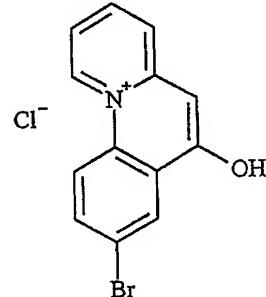
composé 20 (MPB-08)



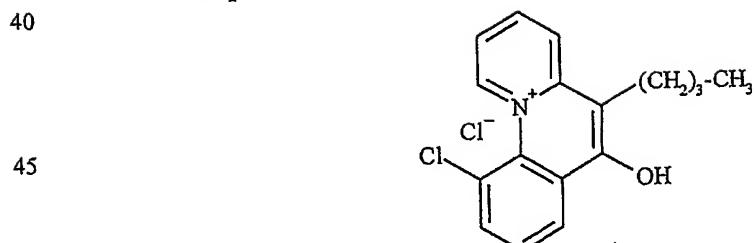
composé 25 (MPB-30)



composé 27 (MPB-32)

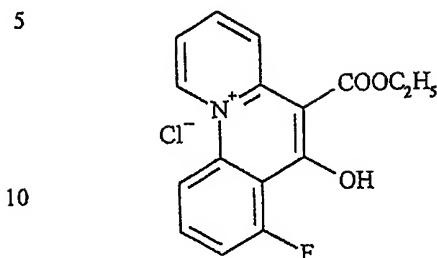


composé MPB-91

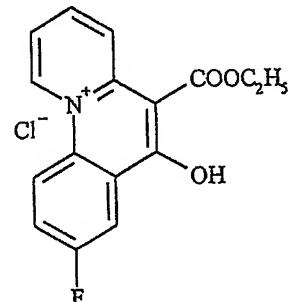


50

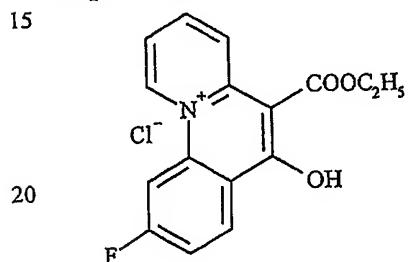
composé MPB 73



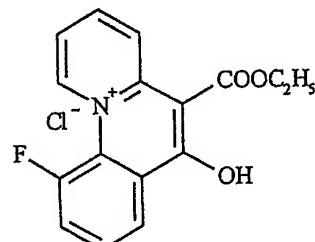
composé MPB 75



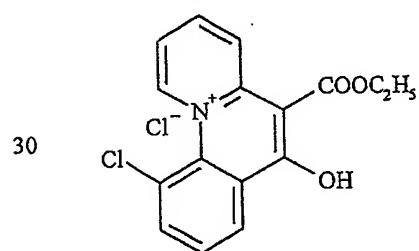
composé MPB 86



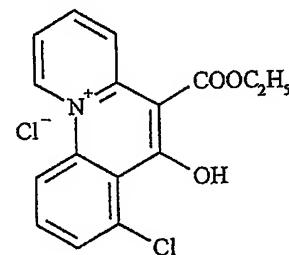
composé MPB 77



25 composé MPB 87



composé MPB 88



35

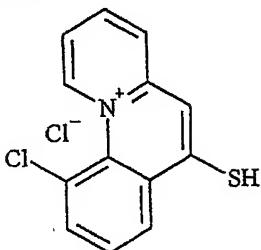
7. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, de dérivés des benzo[c]quinoliziniums de formule (Ia) dans laquelle Y représente SH.

40

8. Utilisation selon la revendication 7, de dérivés des benzo[c]quinoliziniums de formule (Ia) choisis parmi les suivants :

## composé MPB 102

5

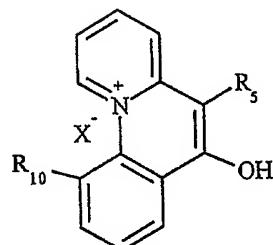


10

9. Utilisation selon la revendication 5, de dérivés de formule générale (Ia-1)

suivante :

15



20

(Ia-1)

dans laquelle :

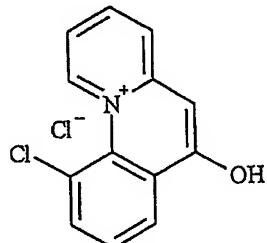
- R<sub>5</sub> représente un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle linéaire ou substitué de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un groupe butyle,
- R<sub>10</sub> représente un atome un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor,
- X représente un atome d'halogène sous forme anionique, notamment un atome de brome Br<sup>-</sup>, ou de chlore Cl<sup>-</sup>, ou un groupe d'atomes sous forme anionique, notamment un perchlorate ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>.

10. Utilisation selon la revendication 9, du dérivé MPB-07 de formule suivante :

## composé 19 (MPB-07)

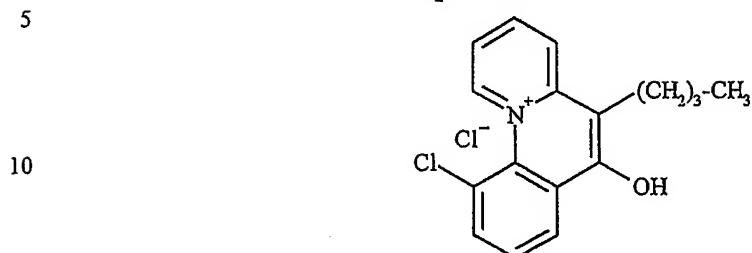
35

40

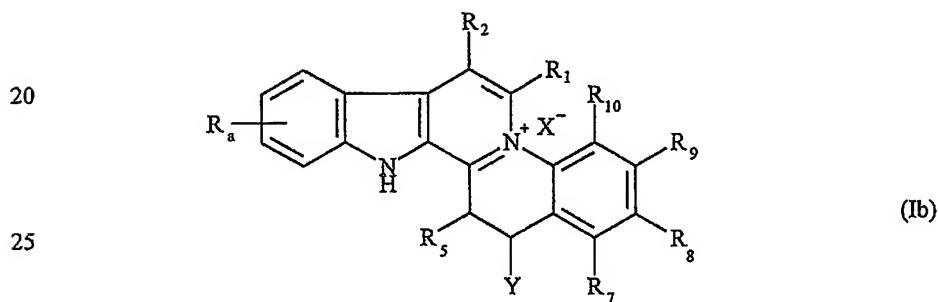


11. Utilisation selon la revendication 9, du dérivé MPB-91 de formule suivante :

composé MPB-91



12. Utilisation selon la revendication 1, de dérivés de formule générale (Ib) suivante :

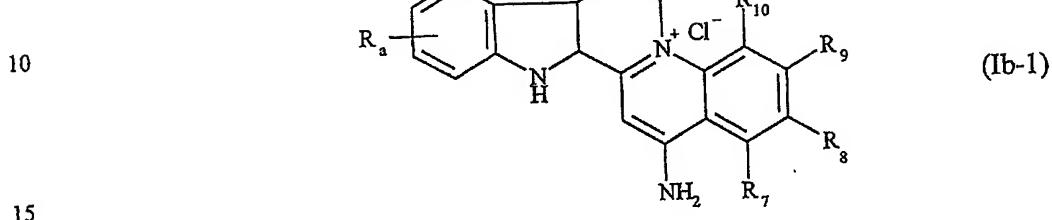


30 dans laquelle R<sub>a</sub>, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, R<sub>10</sub>, X et Y sont tels que définis dans la revendication 1, et notamment les composés de formule (Ib) dans laquelle:

- R<sub>a</sub> représente un atome d'hydrogène,
- R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> représentent un atome d'hydrogène, et il n'y a pas de double liaison entre les deux carbones portant R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub>,
- R<sub>5</sub> représente un atome d'hydrogène,
- R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> et R<sub>10</sub> représentent un atome d'hydrogène, ou l'un de R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> ou R<sub>10</sub> représente un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor,
- Y représente -NH<sub>2</sub>,

- X représente un atome d'halogène, notamment un atome de brome, ou de chlore, ou de fluor.

13. Utilisation selon la revendication 10, de dérivés de formule (Ib-1) suivante :



et plus particulièrement les composés de formule (Ib-1) suivants :

- 20
- composé G : R<sub>7</sub> = Cl, R<sub>8</sub> = R<sub>9</sub> = R<sub>10</sub> = H,
  - composé H : R<sub>7</sub> = R<sub>8</sub> = R<sub>9</sub> = R<sub>10</sub> = H,
  - composé I : R<sub>8</sub> = Cl, R<sub>7</sub> = R<sub>9</sub> = R<sub>10</sub> = H,
  - composé J : R<sub>9</sub> = Cl, R<sub>7</sub> = R<sub>8</sub> = R<sub>10</sub> = H,
  - composé K : R<sub>10</sub> = Cl, R<sub>7</sub> = R<sub>8</sub> = R<sub>9</sub> = H,
  - composé L : R<sub>9</sub> = Br, R<sub>7</sub> = R<sub>8</sub> = R<sub>10</sub> = H.

25

14. Composés de formule (I) telle que définie dans la revendication 1 dans laquelle R<sub>5</sub> représente un ester de formule COOR' dans laquelle R' représente un groupe alkyle linéaire ou substitué de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un groupe éthyle.

30

15. Composés selon la revendication 14, de formule (Ia) telle que définie dans la revendication 2, dans laquelle :

- R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> représentent un atome d'hydrogène, ou forment en association avec C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub> un cycle aromatique à 6 atomes de carbone,

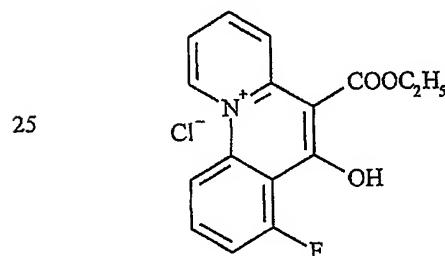
- R<sub>5</sub> représente un ester de formule COOR' dans laquelle R' représente un groupe alkyle linéaire ou substitué de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un groupe éthyle,
- Y représente un groupe -OH, -SH, -NH<sub>2</sub>, ou -NHCOCH<sub>3</sub>,
- 5 - R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> et R<sub>10</sub> représentent un atome d'hydrogène, ou l'un au moins de R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> ou R<sub>10</sub>, représente un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor,
- 10 - X représente un atome d'halogène sous forme anionique, notamment un atome de brome Br<sup>-</sup>, ou de chlore Cl<sup>-</sup>, ou un groupe d'atomes sous forme anionique.

16. Composés selon la revendication 14 ou 15, de formule (Ia) dans laquelle R<sub>5</sub> représente un ester de formule COOR' dans laquelle R' représente un groupe alkyle linéaire ou substitué de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un groupe éthyle, et Y représente un groupe -OH.

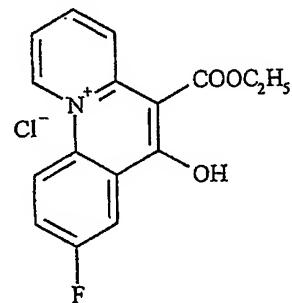
17. Composés selon l'une des revendications 14 à 16, de formules suivantes:

composé MPB 73

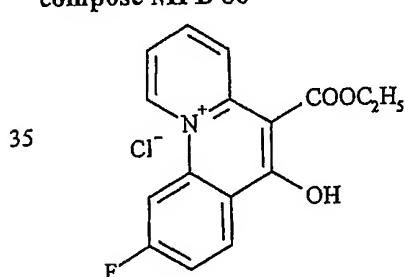
20



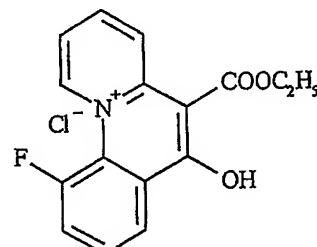
composé MPB 75



composé MPB 86

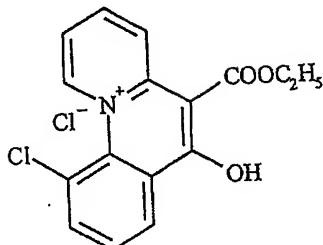


composé MPB 77



composé MPB 87

5



10

18. Composés de formule (I) telle que définie dans la revendication 1 dans laquelle Y représente SH.

15

19. Composés selon la revendication 18, de formule (Ia) telle que définie dans la revendication 2, dans laquelle :

20

- R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> représentent un atome d'hydrogène, ou forment en association avec C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub> un cycle aromatique à 6 atomes de carbone,

- R<sub>5</sub> représente - R<sub>5</sub> représente un atome d'hydrogène, ou un groupe alkyle linéaire ou substitué de 1 à 10 atomes de carbone, notamment un groupe butyle,

- Y représente un groupe -SH,

- R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> et R<sub>10</sub> représentent un atome d'hydrogène, ou l'un au moins de R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> ou R<sub>10</sub>, représente un atome d'halogène, notamment un atome de chlore, de brome ou de fluor,

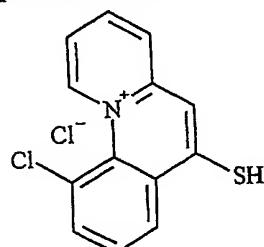
25

- X représente un atome d'halogène sous forme-anionique, notamment un atome de brome Br<sup>-</sup>, ou de chlore Cl<sup>-</sup>, ou un groupe d'atomes sous forme anionique.

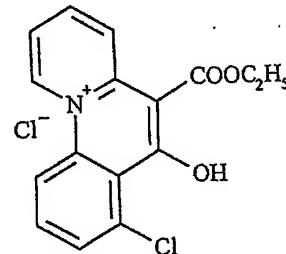
20. Composés selon la revendication 18 ou 19, de formules suivantes:

30 composé MPB 102

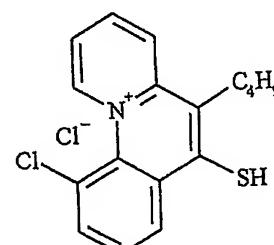
35



composé MPB 88

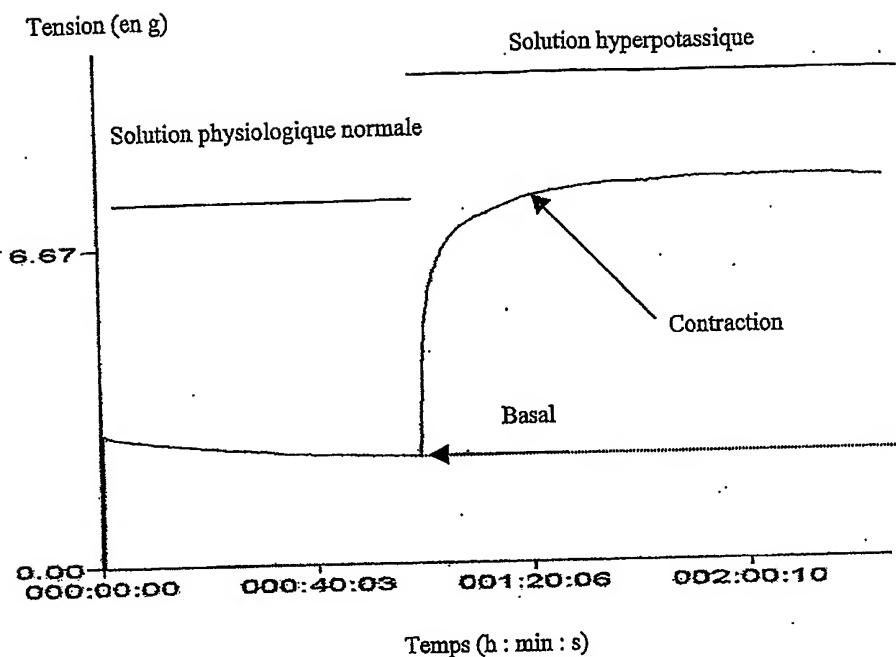


composé MPB 103



21. Compositions pharmaceutiques comprenant au moins un composé défini dans l'une des revendications 14 à 20, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

A.



B.

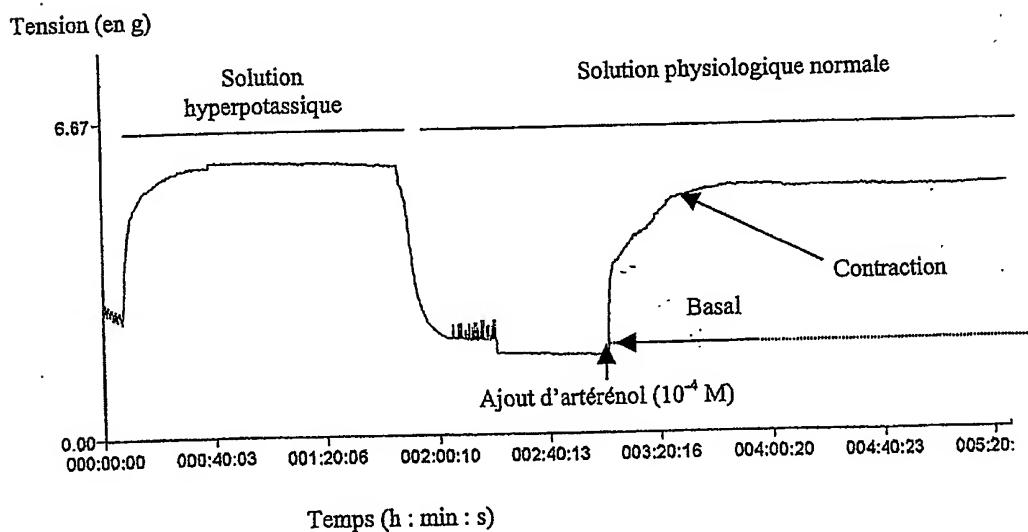
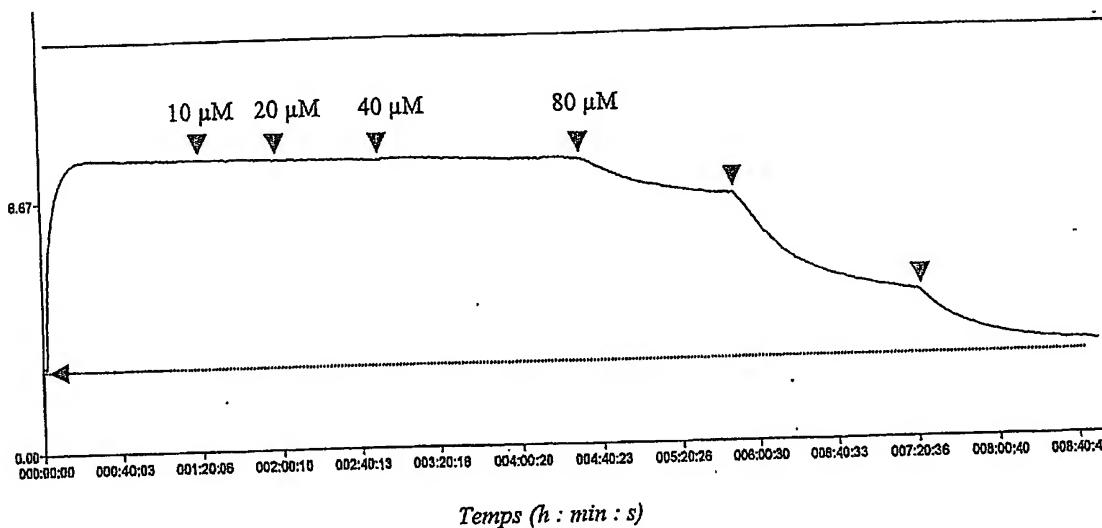


Figure 1

A.

Tension (en g)



B.

Tension (en g)

Milieu hyperpotassique

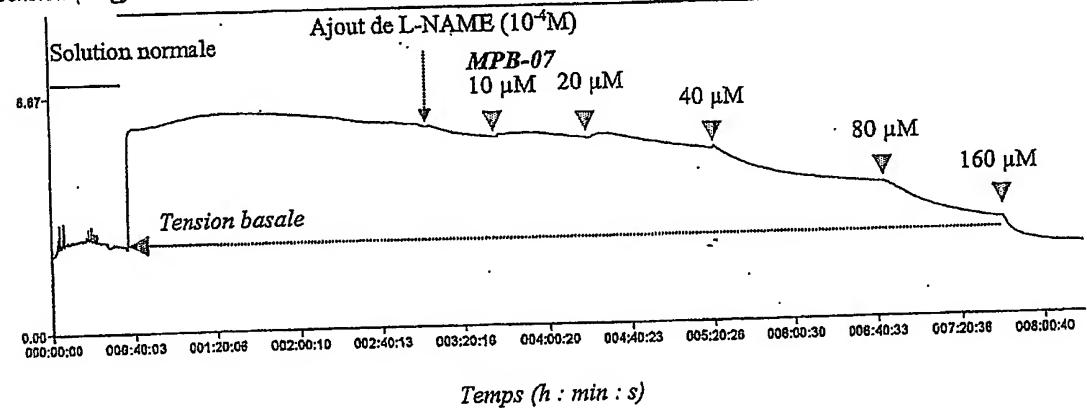


Figure 2

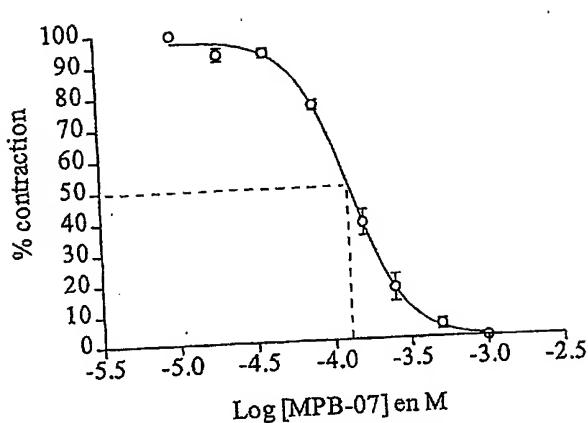
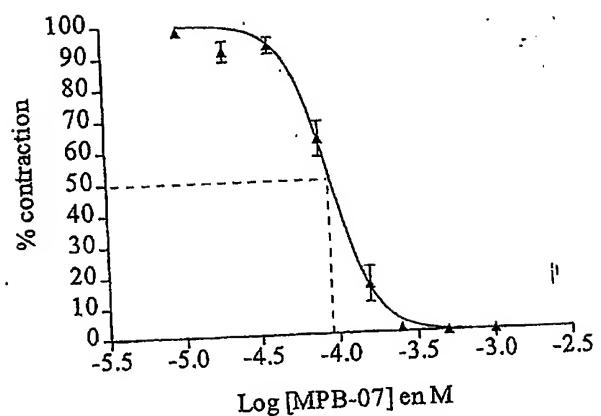
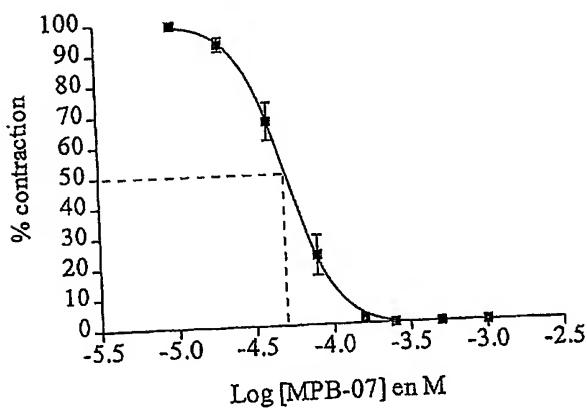
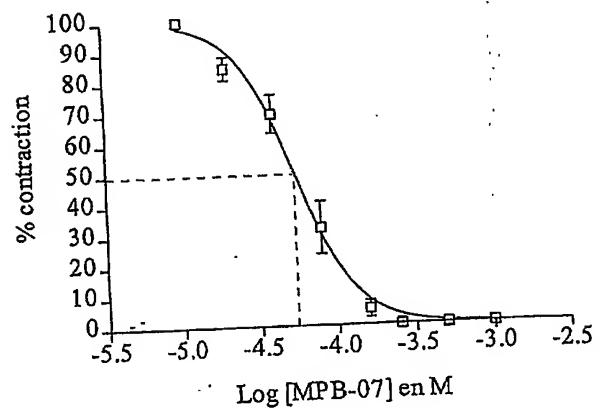
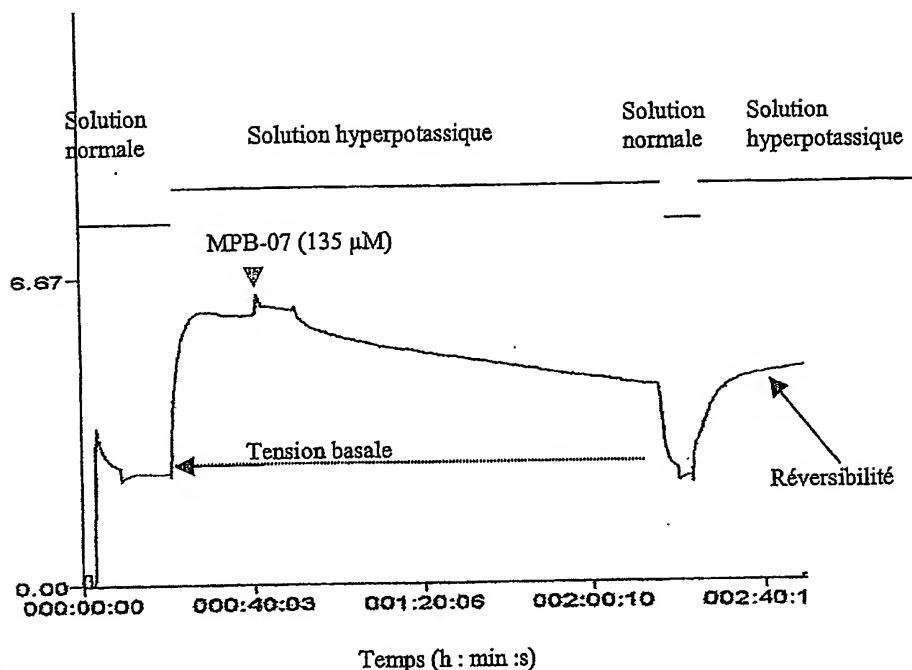
**A.****B.****C.****D.**

Figure 3

A.

Tension (en g)



B.

Tension (en g)

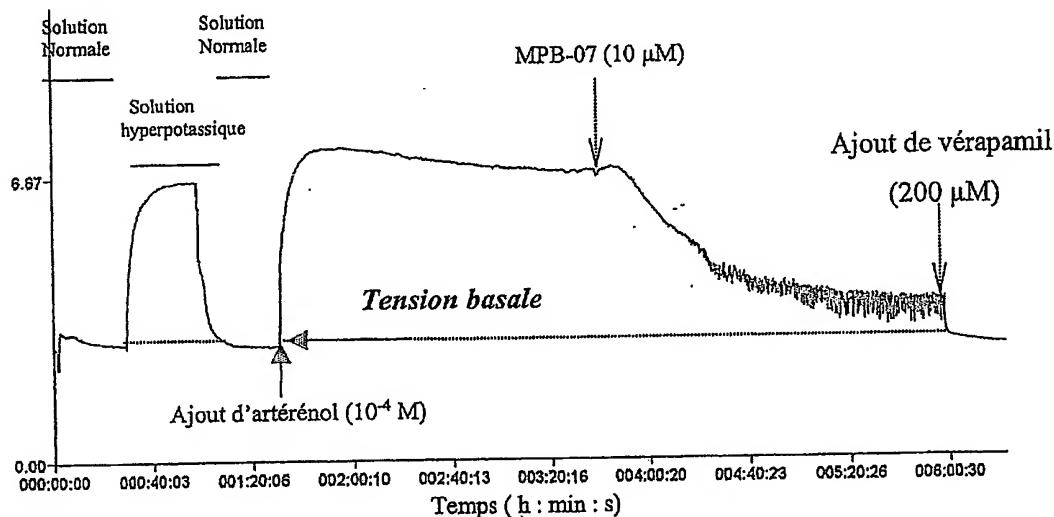


Figure 4

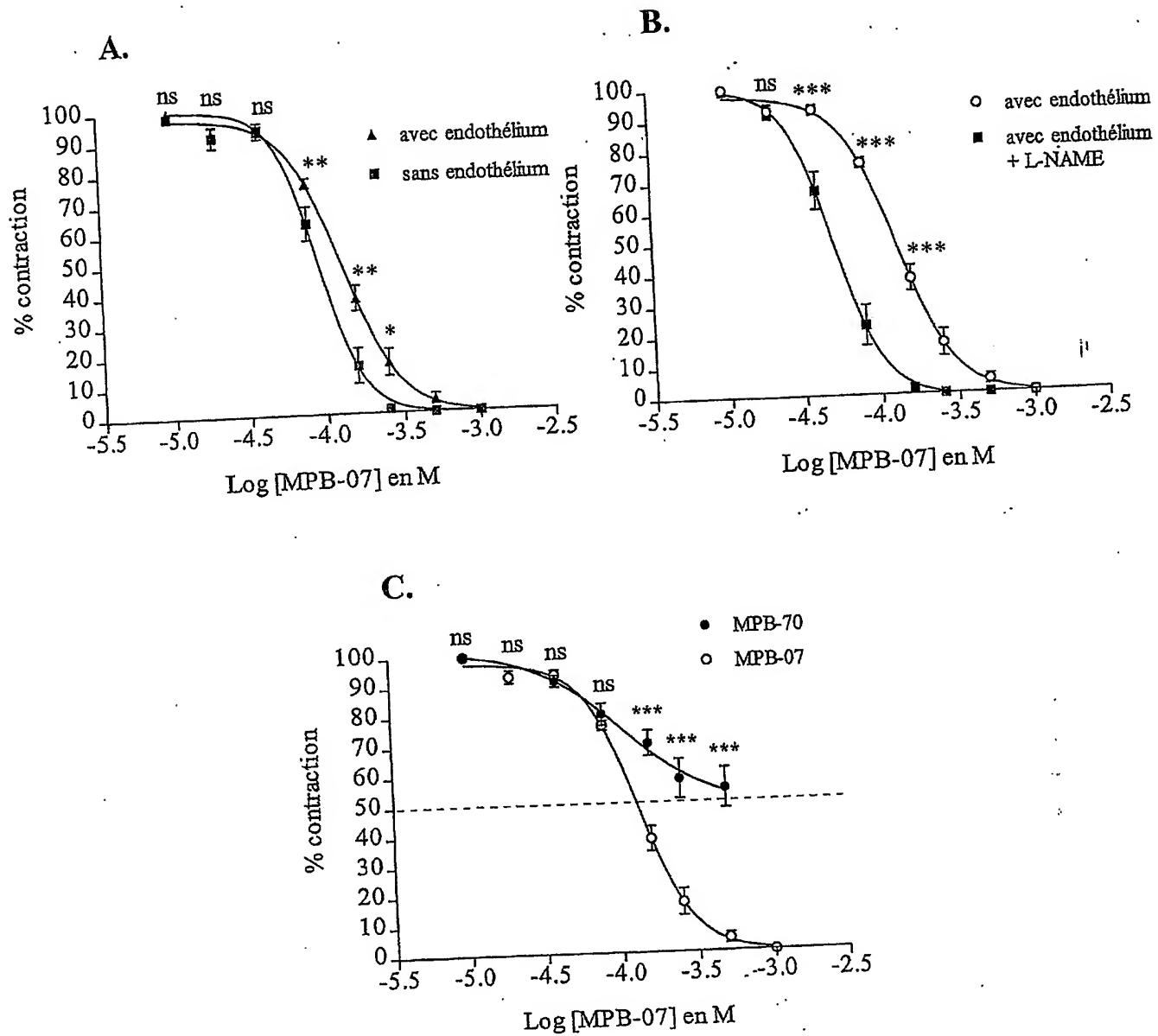


Figure 5

Comparaison d'une gamme de  
MPB-07 et de MPB-91 sur des  
anneaux d'aorte avec endothélium  
précontracturés en solution  
hyperpotassique

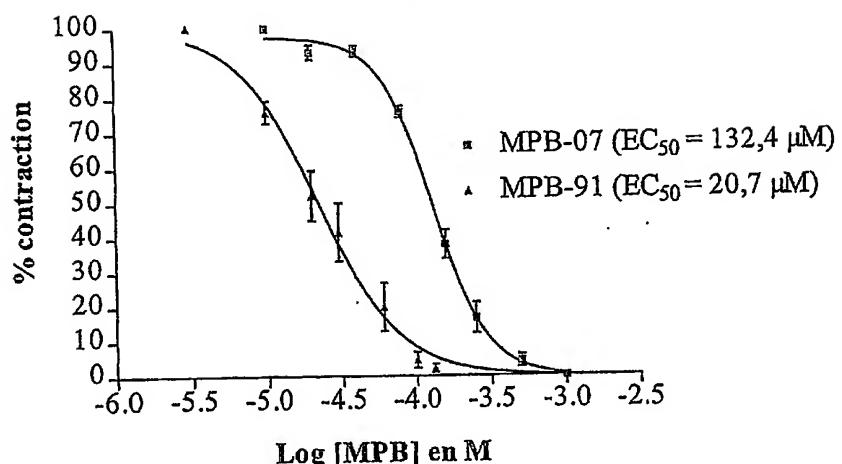


Figure 6

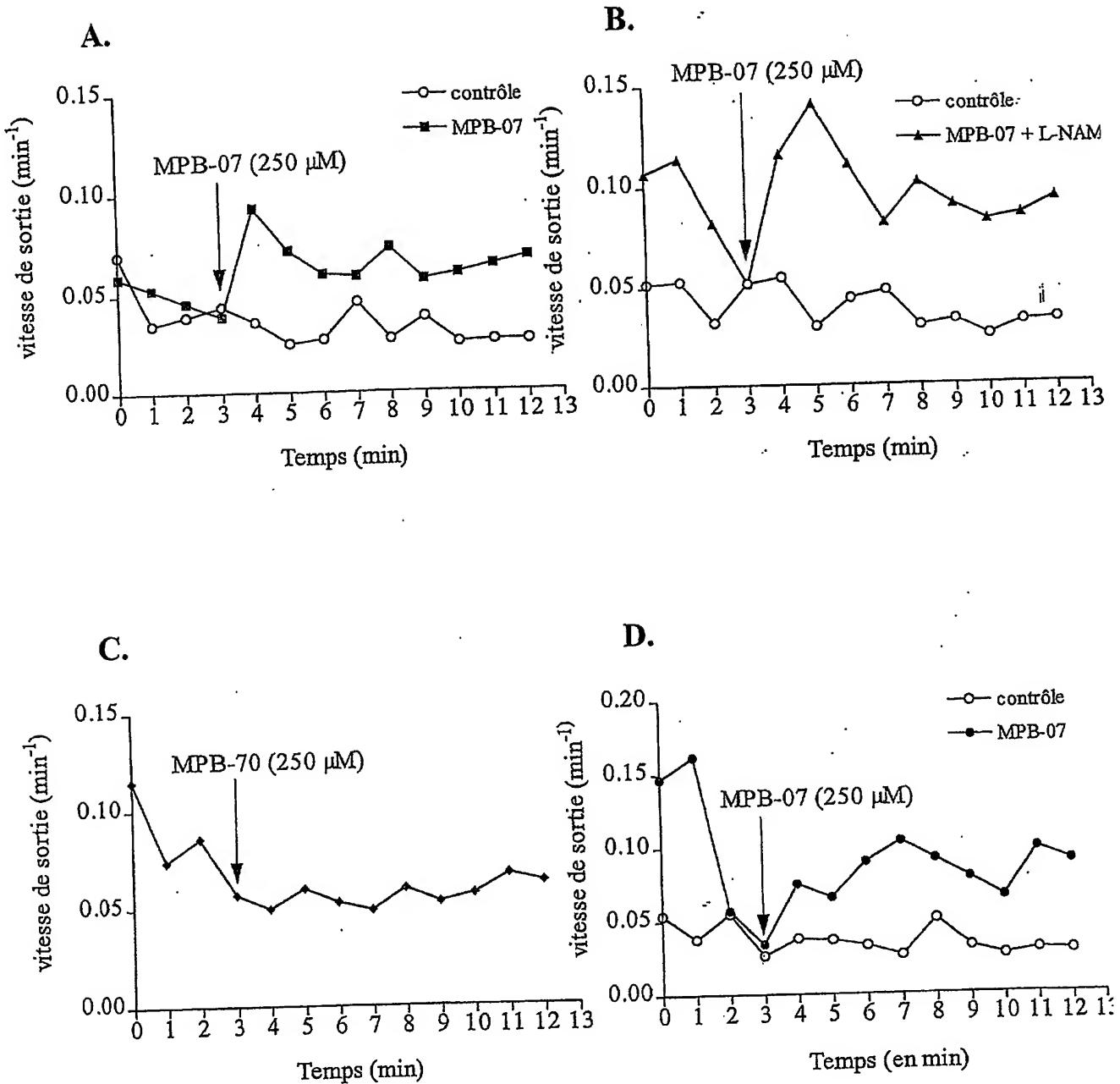


Figure 7

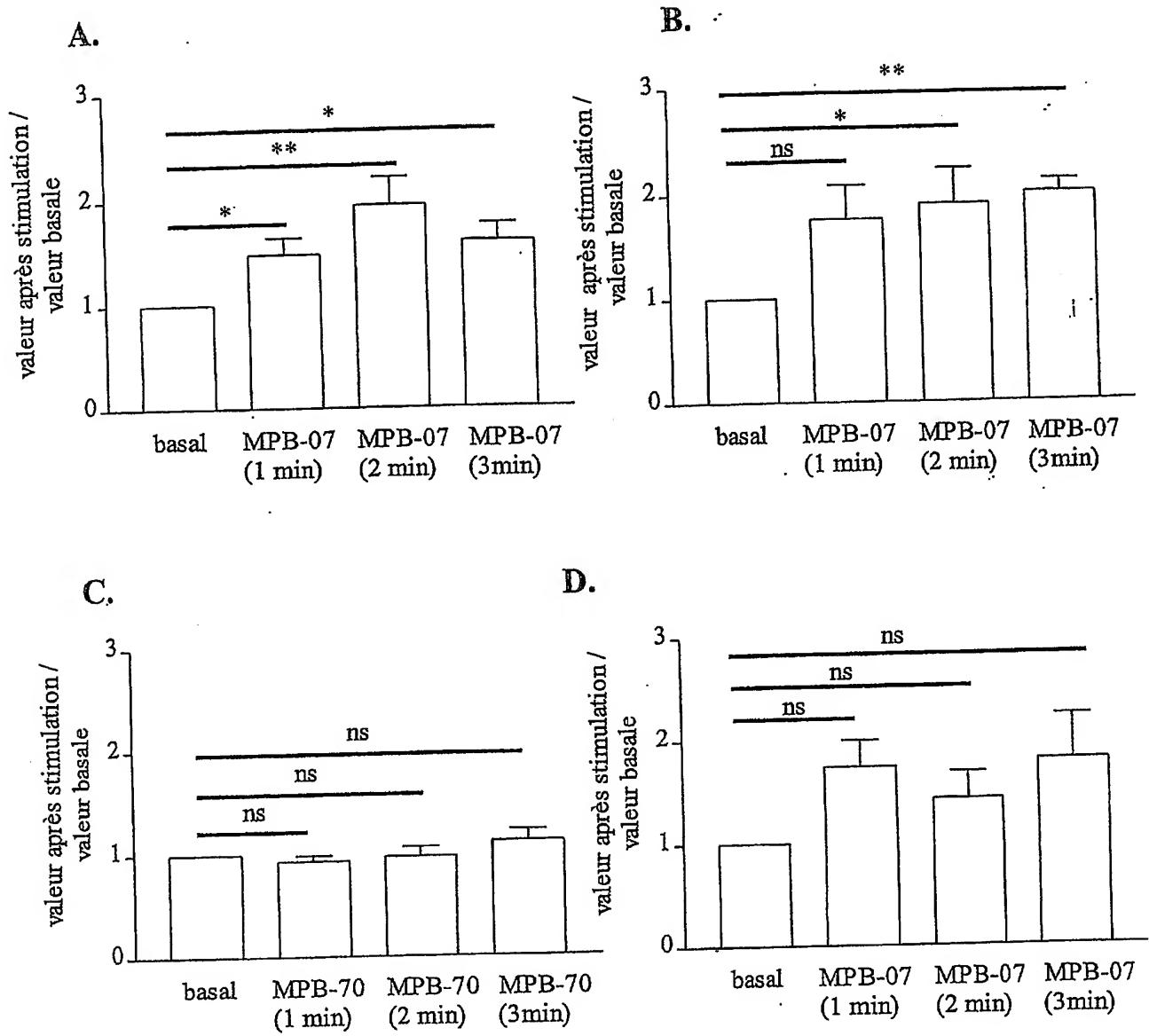


Figure 8

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

### DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1/3.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W /2608

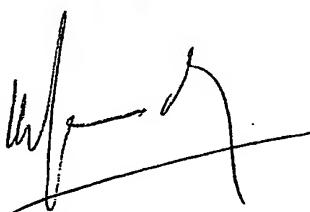
Vos références pour ce dossier <i>( facultatif )</i>	IFB 02 CD CNR VASO
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	02/06916
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)	
UTILISATION DE DERIVES DES BENZO[c]QUINOLIZINIUMS POUR LE TRAITEMENT DES PATHOLOGIES LIEES AUX PHENOMENES DE CONTRACTION DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES	

### LE(S) DEMANDEUR(S) :

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
3, rue Michel-Ange  
F-75794 PARIS CEDEX 16, France

**DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :** (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).

Nom		BECQ	
Prénoms		Frédéric	
Adresse	Rue	Bourgueil	
	Code postal et ville	86300	BONNES
Société d'appartenance <i>( facultatif )</i>			
Nom		ROBERT	
Prénoms		Renaud	
Adresse	Rue	7, avenue Mozart, Rés. Charlemagne, App. 35	
	Code postal et ville	86000	POITIERS
Société d'appartenance <i>( facultatif )</i>			
Nom		PIGNOUX née BULTEAU	
Prénoms		Laurence	
Adresse	Rue	3, rue de la Vallée Chauveau	
	Code postal et ville	86800	JARDRES
Société d'appartenance <i>( facultatif )</i>			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		Paris, le 9 juillet 2002 Charles DEMACHY, Mandataire 422.5/PP170	





## DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

## BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235\*02

## DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2 / 3.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W /260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)	IFB 02 CD CNR VASO
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	02/06916
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)  UTILISATION DE DERIVES DES BENZO[c]QUINOLIZINIUMS POUR LE TRAITEMENT DES PATHOLOGIES LIBES AUX PHENOMENES DE CONSTRICITION DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES	

## LE(S) DEMANDEUR(S) :

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
3, rue Michel-Ange  
F-75794 PARIS CEDEX 16, France

**DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :** (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).

Nom		ROGIER	
Prénoms		Christian	
Adresse	Rue	22, rue du Maréchal Foch	
	Code postal et ville	86000	POITIERS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		METTEY née RENOULT	
Prénoms		Yvette	
Adresse	Rue	5, rue de l'ancienne Comédie	
	Code postal et ville	86000	POITIERS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		VIERFOND	
Prénoms		Jean Michel	
Adresse	Rue	2, rue Molière	
	Code postal et ville	94700	MAISONS ALFORT
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		Paris, le 9 juillet 2002 Charles DEMACHY, Mandataire 422.5/PP170	



INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

cerfa  
N° 11235\*0

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 3./3.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W /2601

Vos références pour ce dossier <i>( facultatif )</i>	IFB 02 CD CNR VASO
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	02/06916
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)	
UTILISATION DE DERIVES DES BENZO[c]QUINOLIZINIUMS POUR LE TRAITEMENT DES PATHOLOGIES LIEES AUX PHENOMENES DE CONSTRICITION DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES	

LE(S) DEMANDEUR(S) :

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
3, rue Michel-Ange  
F-75794 PARIS CEDEX 16, France

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).

Nom		JOFFRE	
Prénoms		Michel	
Adresse	Rue	16, rue des Arènes Romaines	
	Code postal et ville	86000	POITIERS
Société d'appartenance ( <i> facultatif </i> )			
Nom		MARIVINGT-MOUNIR	
Prénoms		Cécile	
Adresse	Rue	30, rue des Douves, Résidence de la Chanterie	
	Code postal et ville	86000	POITIERS
Société d'appartenance ( <i> facultatif </i> )			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance ( <i> facultatif </i> )			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		Paris, le 9 juillet 2002 Charles DEMACHY, Mandataire 422.5/PP170	